

⑫ 公表特許公報(A)

平2-503269

⑬ 公表 平成2年(1990)10月11日

⑭ Int.Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求
 C 12 P 21/02 C 8214-4B 予備審査請求 未請求 部門(区分) 1(1)
 8717-4B C 12 N 15/00 A
 6807-4B 5/00 B※
 (全 51 頁)

⑮ 発明の名称 可溶性T4の誘導体

⑯ 特 願 平1-503131

⑰ 翻訳文提出日 平1(1989)10月24日

⑱ 出 願 平1(1989)2月24日

⑲ 国際出 願 PCT/US89/00762

⑳ 国際公開番号 WO89/08143

㉑ 国際公開日 平1(1989)9月8日

優先権主張 ㉒ 1988年2月24日 ㉓ 米国(US) ㉔ 160,348

㉕ 発 明 者 マドン, ボール・ジェイ アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10032、ニュー・ヨーク、ヘイ
ブ・アベニュー・60㉖ 出 願 人 ザ・トラステイズ・オブ・コ アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10027、ニュー・ヨーク、ウエ
ロンビア・ユニヴァーシティ・ スト・ワンハンドレッド・アンド・シックスティーン・ストリー
イン・ザ・シティ・オブ・ニュー ト・アンド・ブロードウェイ (番地なし)
ー・ヨーク

㉗ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名

㉘ 指 定 国 AU, DK, FI, HU, JP, KR, NO

最終頁に続く

浄書(内容に変更なし)

請求の範囲

(1) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質と特異的に結合体形成可能な治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+185までが約+351から約+369までのアミノ酸配列に融合したものであることを特徴とする治療剤。

(2) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質と特異的に結合体形成可能な治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+106までが約+351から約+369までのアミノ酸配列に融合したものであることを特徴とする治療剤。

(3) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質と特異的に結合体形成可能な治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+185までのものであることを特徴とする治療剤。

(4) 請求項1、2又は3のいずれかに記載の治療剤の有効量と医薬的に適用可能な担体とから成る医薬組成物。

(5) 請求項4の医薬組成物の有効量を患者に処方することから成るヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法。

(6) 請求項1、2又は3のいずれかに記載のポリペプチドをエンコードする発現ベクター。

(7) 請求項6の発現ベクターから成る宿主細胞。

(8) 細菌宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(9) 大腸菌宿主細胞である請求項8の細菌宿主細胞。

(10) 真核宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(11) 哺乳類宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。

(12) 酵母宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。

(13) 昆虫宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(14) 請求項6の発現ベクター系を適する条件で育成し、治療剤を生産させ、かくして得られた治療剤を回収することから成る請求項1、2又は3のいずれかに記載の治療剤の生産方法。

可溶性T4の誘導体

本出願は1987年10月23日出願の米国特許出願第114,244号の一部継続出願であり、該出願は1986年8月21日出願の米国特許出願第898,587号の一部継続出願であり、これらの特許出願の記載内容は本出願に含まれるものとする。

発明の背景

本明細書ではいくつかの参考文献を括弧内にアラビア数字で示し、これらの参考文献の一覧を明細書の末尾に添付した。本発明が属する分野の現状を十分に理解するために引用されたこれらの参考文献の記載内容は本出願に含まれるものとする。

Tリンパ球の異なる機能クラスは、異なる標的細胞集団の表面の抗原を認識する。ヘルパーT細胞は主としてマクロファージ及びB細胞と相互作用する。細胞障害性T細胞はより広い範囲の抗原保有標的細胞と相互作用する。これらの細胞認識事象は、エフェクター細胞及び標的細胞の双方の表面分子の特異的会合によって媒介されると推定できる。T細胞の表面の特徴は、多数の多形及び非多形タンパク質を有することであり、これらのタンパク質の大部分はTリンパ球に限定されている。これらの分子の多くはすべ

標的細胞相互作用におけるこれらの分子の重要性はモノクローナル抗体を用いた研究によって証明され得る。T4分子(または対応するマウスの分子L3T4)の特異的エピトープに対する抗体は、抗原誘発T細胞増殖、リンフォカイン遊離及びヘルパーT細胞機能を阻害する(7、8、11、12、13)。同様に、T8(または対応するマウスの分子Lyt2)に対するモノクローナル抗体は細胞障害性T細胞媒介キラー作用を阻害する(14、15)。これらの観察及びT4とT8とが有意な多形性を表わさない事実に基づいて判断すると、T4及びT8がクラスⅡ及びクラスⅠの分子の非多形領域を夫々認識すると推定し得る。

異なるエフェクターT細胞に基づく違いを有すると考えられる第2のクラスのタンパク質は、MHC分子の多形領域と会合する抗原を認識するレセプターである(16、17、18)。ヘルパーTリンパ球の相互作用は主としてクラスⅡのMHCタンパク質を発現する抗原保有標的細胞に限定され、他方、細胞障害性及びサブレッサーT細胞はクラスⅠのMHC分子を担う標的細胞に限定される(4、5、6、7、8、9)。これらの特異的相互作用は、特異的MHC分子に関連して抗原を認識する(1つまたは複数の)T細胞レセプターによって媒介

てのT細胞に共通であるが、2つのクラスの表面タンパク質の違いは常にT細胞の機能クラスの違いに基づく。これらのタンパク質はT細胞-標的細胞相互作用に関与していた。

1つのクラスの表面分子はTリンパ球の主要な機能サブセット即ち表面糖タンパク質T4及びT8を識別する。胸腺発達初期に糖タンパク質T4及びT8は胸腺細胞の表面で同時発現される(1)。末梢免疫系において、T4分子及びT8分子はT細胞の相互排他的サブセットにおいて発現され、同じ細胞において発現されることはめったにない(2、3)。T4分子はクラスⅡの主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)分子を保有する標的細胞と相互作用するT細胞において発現される。他方、T8を担うT細胞はクラスⅠのMHCタンパク質を発現する標的と相互作用する(4、5、6、7、8、9)。Tリンパ球のT4集団はヘルパー細胞を含み、他方、T8集団は細胞障害性及びサブレッサー細胞の大部分を含む(6、10)。しかしながら、希少なT4⁺のT細胞は細胞障害性またはサブレッサー細胞として機能でき(6、10)、これはT4またはT8の発現がエフェクター機能よりもMHCクラスの認識に緊密に(stringently)関連していることを示唆する。T細胞-

され得る。従って、Tリンパ球はMHCタンパク質の不変決定基及び多形決定基を認識し得る独立の2つのレセプターを有するであろう。これらのレセプターは機能的に異なるT細胞集団を特異的標的とする役割を果たす。

ヒト後天性免疫不全症候群(エイズ、AIDS)の特徴は、T4⁺リンパ球が欠失していることにある。その結果として、エイズ患者ではT細胞媒介免疫性が損傷され、重大な日和見感染及び異常な新生物が発生する。エイズは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と命名された類縁レトロウイルス(LAV、HTLV-ⅢまたはARV)の集団がTリンパ球に感染することによって発症する。これらの病原体の感染力の範囲は、その表面にT4糖タンパク質を発現する細胞に限定されている。

従って、T4糖タンパク質は標的細胞の表面の分子のレセプターとして機能するだけでなく、エイズウイルスのレセプターの機能も果たす。T4に対するモノクローナル抗体は、T4⁺細胞のin vitroエイズウイルス感染を阻止する。更に、最近の研究から、T4⁺Tリンパ球がエイズウイルスに接触するとウイルスの110kdのエンベロープ糖タンパク質が宿主細胞のT4分子と会合することが判明した。従ってウイルスの向リンパ性はTリンパ球のサブ集団中のレセプターT4

の限定された発現によって説明できた。

エイズではT4⁺ Tリンパ球の欠失によって細胞性免疫応答が損なわれる。また多くの場合にはエイズに伴って、殆どが亜急性脳炎(subacute encephalitis)に起因する中枢神経系(CNS)の機能障害が生じる。エイズウイルスのRNA及びDNAは感染脳から同定され、神経系疾患に罹患した患者の脳及び脳脊髄液からウイルスが単離された。これらの観察は、エイズウイルスが脳細胞に感染し、該ウイルスがエイズ患者で観察されるCNS病変の直接原因であることを示唆する。従って、エイズは向リンパ性であると同時に向神経性である。従って、T4がCNS中で発現されたのかまたは付加的な脳特異的表面分子がエイズウイルスのレセプターとして機能するのかを判断することが重要である。

T4及びT8の特異的相互作用の解明は、T4及びT8遺伝子を単離でき、それらの構造を決定し、種々の細胞環境に導入できれば容易に行なわれるであろう。T8分子をコードするcDNAの単離及び配列が最近報告された(19、20、21)。推定されたタンパク質配列は、T8が免疫グロブリンL鎖の変異部との相同性を含むN末端ドメインをもつ膜結合糖タンパク質であることを示す。

したヤギ抗マウス免疫グロブリンと共にインキュベートした。細胞をFACS IV Cell Sorterで分析し、VAX 11/780コンピュータにより蛍光の対数値に対する細胞数としてプロットした。非形質転換NIH 3T3細胞及びL細胞は同一のサイトフルオログラフィーパターンを示した。Fro 2.2はT3⁺、T4⁺、T8⁺、T11⁺の表現型を有する白血病T細胞系であり、LTD-4は全ゲノムDNAの転移後に得られるT4⁺一次L細胞の形質転換体である。3A⁺はT4-pHV6tk/neoレトロウイルス発現構築物で形質転換したNIH 3T3細胞系である。

第2図. T4⁺及びT4⁻L細胞及びヒト細胞に由来するRNAのノーザンブロット分析

3 μ gのポリ(A)⁺RNA又は12 μ gの全RNA(末梢T細胞及び胸腺リンパ球)を0.8%アガロース-ホルムアルデヒドゲル中で電気泳動させ、GeneScreen (New England Nuclear)に吸着させ、³²Pで標識した0.6kb T4 cDNAインサートでアプローブした。T4⁺細胞はLTD-4(T4⁺、T8⁺L細胞の形質転換体)、SK-7 T細胞ハイブリドーマ(T4⁺、T8⁺)、OT-CLL白血病(T4⁺、T8⁺)、Fro 2.2白血病(T4⁺、T8⁺)、T4沃化末梢Tリンパ球、及びヒト胸腺リンパ球を含む。T4⁻細胞は、非形質転換細胞、tk7(T8⁺L細胞の形質転換体)、HeLa細胞、ヒト神経芽

発明の要約

本発明は、ポリペプチドを含有するヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質との複合体を特異的に形成することが可能な治療剤を提供する。本発明の1態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351〜約+369のアミノ酸配列に融合した約+3〜約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の別の態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351〜約+369のアミノ酸配列に融合した約+3〜約+106の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の更に別の態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+3〜約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法も提供する。該方法は、有効量の本発明の治療剤と医薬上許容可能なキャリアーとを含有する有効量の医薬組成物を患者に投与することから成る。

図面の簡単な説明

第1図. OKT4及びOKT8を用いた間接免疫蛍光染色のサイトフルオログラフィーパターン

細胞(5 \times 10⁵)をマウスモノクローナル抗体OKT4B又はOKT8と共にインキュベートし、洗浄し、その後、FITCで標識

腫細胞(IMR)、及びT8沃化末梢Tリンパ球を含む。ヒト胸腺リンパ球レーンを4倍の時間で露光し、硬調フィルムで写真撮影した。

第3図. pT4B及びT4遺伝子の制限ヌクレアーゼ地図、配列決定方法及び組換えベクター

A. pT4B cDNA及びT4遺伝子のBam HI制限フラグメントのアラインメント。T4遺伝子におけるBam HIフラグメントの順序はサザンブロット分析及びゲノムクローンマッピングにより決定した。pT4B及びT4遺伝子の5'末端のアラインメントを点線により示し、pT4Bの塗りつぶし領域はコーディング配列に対応する。指示した寸法の単位はキロベースである。

B. 配列決定方法。矢印はフラグメントをM13にサブクローニングし、チェーンターミネーター法(36)により配列決定することにより決定した配列範囲を示す。

C. 真核細胞発現ベクター。これらの構築物は、矢印により示すような配向を有する2つのモロニーマウスウイルスの長い末端反復(LTR)を含む。pT4B cDNAを指示した配向で各ベクターのEco RI部位にサブクローニングした。(a)T4-pVcos7構築物。(b)T4-pHV6tk/neo構築物はHSVチミジンキ

ナーゼプロモーターに融合したネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む。

第4図. 非形質転換及びT4-L細胞、並びにT、B及び非リンパ性ヒト細胞からのDNAのサザンブロット分析

10 μ gの細胞DNAをBam HIで消化し、0.8%アガロースゲル中で電気泳動させ、GeneScreenに吸着させ、ニック翻訳したpT4B cDNAインサートでプローブした。指示した寸法の単位はキロベースである。全てのヒトDNAには20kb、6.6kb、4kb、1.8kb及び1kbの寸法のハイブリダイジングバンドが現れている。非リンパ性起源のT4⁺からのDNAは非形質転換L細胞、ヒト線維芽細胞(CM)、ヒト神経芽腫細胞(NB)、及びBeLa細胞を含む。CB、CP58及びCP94はEBVで形質転換したヒトB細胞系に由来するDNAである。LTD-4はT4⁺一次L細胞の形質転換体である。RPM1及びHSB2はT4⁺ヒトT細胞白血病系であり、E⁺細胞及び胸腺リンパ球(Thym.)はT4⁺T細胞を含む。OT-CLL、Jurkat(Jurk.)、Fro2.2、CEM及びMolt 4はT4⁺細胞である。g λ M4はT4遺伝子の3'末端に位置する配列を含むゲノムクローンである。

第5図. レトロウイルス発現構築物で形質転換したNIH 3T3からのT4糖タンパク質の免疫沈降

す。全細胞外システインには(●)又は(○)を付した。リーダー配列領域(L)、可変領域(V)、結合領域(J)、トランスメンブラン領域(TM)及び細胞周辺(CYT)領域を配列の下の方の水平方向の矢印により示したが、正確な境界ははっきりしていない。2つの可能なN結合グリコシル化部位(Asn-Leu-Thr)も示した(C80)。

第7図. SP6転写から誘導されるin vitro翻訳RNA

完全な長さのT4 cDNAインサートをRNA発現ベクターpSP65 (Promega Biotec)にサブクローニングした。開環したプラスミドDNAをSP6ポリメラーゼ(40)で転写し、L-[³⁵S]-メチオニンを含むする小麦胚系(Bethesda Research Laboratories)で翻訳した。in vitro翻訳生成物を10% SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動させた(レーンT4)。ウシ下垂体RNA(BP)を対照として使用した。相対分子量(Mr)をキロダルトンで示す。

2つの独立したNIH 3T3形質転換細胞、末梢Tリンパ球及び非形質転換3T3細胞からのタンパク質をL-[³⁵S]-メチオニンで標識し、ヒラマメレクチンクロマトグラフィーにかけ、糖タンパク質を沃化した。各サンプル2.5 \times 10⁶cpmを予め清澄化し、その後、OKT4モノクローナル抗体及びタンパク質A-セファロースで免疫沈降させた。ビーズを洗い、サンプル緩衝液に溶解させ、還元(レーンa~d)及び非還元(レーンe及びf)条件下に10% SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動させた。レーンaは非形質転換NIH 3T3細胞に関する。レーンbは、T4C2、即ちT4-pVcos7構築物で形質転換したNIH 3T3細胞に関する。レーンc及びeは、3A⁺、即ちT4-pHV6tk/neo構築物で形質転換したNIH 3T3細胞に関する。レーンd及びfは末梢ヒトTリンパ球に関する。相対分子量(Mr)をキロダルトンで表す。

第6図. T4 cDNAのヌクレオチド配列及びT4タンパク質の翻訳配列

本図は、第3B図に要約した配列決定方法に従って得られたcDNAクローンpT4Bのヌクレオチド及び予想されるアミノ酸配列図である。アミノ酸配列の上に示した数字はアミノ酸残基の位置を表す。右側の数字はヌクレオチド位置を表す。

第8図: 細胞膜にまたがるT4グリコプロテインの簡略説明図

T4はタンデムVJ様ドメイン(V₁J₁-V₂J₂)と、膜にまたがる(membrane spanning)疎水性セグメント(影の部分)と、荷電(charged)細胞質領域(CYT)とからなる。細胞外部分の2つの潜在的N結合グリコシル化部位は(---)で示されている。T4遺伝子中のイントロン2-8の位置も()で示されている。

第9図: T4の可変領域、接続領域及びトランスメンブラン領域とイムノグロブリン遺伝子型メンバーとのアラインメント

A. T4の可変領域アミノ酸配列と、マウスカッパL鎖イムノグロブリンJ606(66)、T8(20)、ヒトT細胞抗原レセプター β -鎖YT35(97)及びヒトT細胞抗原レセプター α -鎖HPB-MLT α (98)とのアラインメント。L鎖可変領域内の不変残留物(Inv.)はこのアラインメント中に含まれる。このアラインメントは、箱で囲まれた残留物として現れるT4に対するアイデンティティーと構造ホモロジーとを最大化するために行った。文字A、B、C、C'、D、E、及びGを付した配列の下の方の線は β -ストランドを形成する残留物を示す。 β -ス

トランドCはJ配列中に続いている。

B. T4の接続領域(joining region)アミノ酸配列とT細胞抗原レセプター β -鎖のコンセンサスJ配列、イムノグロブリンラムダ及びカッパL鎖、及びヒトT細胞レセプター α -鎖のJ配列とのアラインメント(99)。

C. T4のトランスメンブラン領域とMHCクラスII β -鎖とのアラインメント(100)。推定上のトランスメンブランドメイン(TM)は配列の下に示されている。

第10図:ヒト染色体DNAのT4遺伝子の制限ヌクレアーゼマップ

9つのエキソンの位置をゲノムクローンマップの作成、サザンブロット分析及びヌクレオチド配列によって調べた。リーダー配列(L)、可変領域と思われる領域(V)、接続領域と思われる領域(H)、トランスメンブラン領域(TM)及び細胞質(CYT)領域は箱で囲まれている。開始コンセンサス配列で包囲されたメチオニンコドンの位置はリーダーエキソン(L)の冒頭部分に示されている(ATG)。終結コドンTGAは第2細胞質エキソン(CYT)の末尾に示されている。ここに示した大きさの単位はキロベースである。

第11図:組換えレトロウイルス発現ベクター及び形質転換

してプロットした。感染ウイルス力価(10⁵0)は、培養物の50%がウイルスに関して陽性を示す時の希釈度の逆数として示す(47)。自然に単離したT4⁺細胞は、フィトヘマグルチニン(PHA)で刺激された正常抹消リンパ球(●—●)とT細胞系CEM(○—○)とを含む。トランスフェクションにかけられたT4⁺細胞系はHSB2-T4⁺T細胞(▲—▲)とRaji-T4⁺B細胞(●—●)とを含む。トランスフェクションにかけられたT8⁺細胞系HSB2-T8⁺及びRaji-T8⁺(□—□)は、これらの検査の対照として使用した。

第13図:T4⁺HeLa形質転換細胞中のシンシチウム(Syncytia)の形成

A. 2×10⁵の単層HeLa-T4⁺形質転換細胞を2×10⁵のエイズウイルス産生H9細胞と混合し、37℃でインキュベートした。18時間後に培養物を調べたところ、単層シート中の核の90%以上がシンシチウム中に含まれていた。

B. 接種時に抗R4Aモノクローナル抗体(1:20)を前記混合培養物に加えた。18時間後に培養物を調べたところ、細胞融合は全く見られなかった。

培養物を倍率180xで撮影した。

第14図:T4⁺形質転換細胞へのエイズウイルス結合の流動組

細胞の形成

A. 組換えレトロウイルス発現ベクター。pMV7は矢印の方向で直接的に繰り返される2つのMoloneyネズミsarcomaウイルスLTR(long terminal repeats)を含む。pMV7はまた、HSVチミジンキナーゼプロモーター(tk)に融合された細胞ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo)も含む。T4(T4B)(70)又はT8(T8F1)(20)をコードする完全な長さのcDNAインサートを矢印の方向に従ってEco RI部位にサブクローンした。夫々T4-pMV7及びT8-pMV7が形成された。コーディング配列は影の部分で示されている。ここに示した大きさの単位はキロベースである。

B. レトロウイルスを介する遺伝子トランスファーの方法 第12図:自然に単離され且つ形質転換されたT4⁺細胞の感染効率

細胞に、10倍ずつで希釈した一連のエイズウイルス希釈物を接種し、37℃で18時間インキュベートし、洗浄後にマイクロカルチャーでプレーティングした(plated in microculture)。感染後12日目に、感染培養物の頻度をELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)によって調べた(46)。結果を、陽性培養物%対ウイルス希釈度logと

胞計測分析

コラムA. 細胞(5×10⁵)をフルオレセイン結合抗T4A(——)又は抗TB(---)モノクローナル抗体と共にインキュベートし、細胞蛍光定量法(cytofluorometry)によって分析した。抗体B. 細胞(5×10⁵)をバッファ(---)又はエイズウイルス(——)と共にインキュベートし、洗浄し、フルオレセイン結合抗エイズウイルス抗体と共にインキュベートし、細胞蛍光定量法によって分析した。

コラムC. 細胞(5×10⁵)をバッファ(---)又はエイズウイルスの前の抗T4Aモノクローナル抗体(——)もしくはエイズウイルスの前の抗TBモノクローナル抗体(---)と共にインキュベートした。洗浄後、フルオレセイン結合抗エイズウイルス抗体を加え、細胞を細胞蛍光定量法によって分析した。

各細胞系の蛍光ヒストグラム(細胞数対蛍光強度)は水平にアレンジされる。

第15図:ヒト及びマウス脳細胞、リンパ球及び骨髓細胞から誘導したRNAのノーザンブロット分析

A. ヒトRNA試料のノーザンブロット分析。Raji(T4⁺B細胞系)、U937(T4⁺単球細胞系)及びJurkat(T4⁺T細胞系)か

らのポリ(A)⁺RNA 1マイクログラムと、大脳皮質からのポリ(A)⁺RNA 5マイクログラムとを1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、Hybond(Amersham)上にプロットし、³²P-標識T4cDNAインサート、pT4B(70)でプローブした。

B. マウスRNA試料のノーザンプロット分析。前脳及び後脳3T3細胞(線維芽細胞系)からのポリ(A)⁺RNA 5マイクログラムと、胸腺からの総RNA 20マイクログラムとを1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、Hybond上に移し、³²P-標識L3T4cDNAインサート、pL3T4Bでプローブした。

第16図: psT4DHFRのアラスミドマップ

アラスミドpsT4DHFRは、T4のリーダー及び細胞外セグメントをコードするT4cDNAクローンpT4Bのbp 1-1257を含むpUC18誘導体である。このsT4 cDNAをSV40初期(early)プロモーターとウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化領域の前のTAA終結コドン(インセット)を含む合成リンカーとの間に挿入する。sT4発現カセットは、 β -グロビンプロモーターとマウスdhfrコーディング配列とSV40ポリアデニル化領域とで構成されたマウスdhfr発現カセットに結合する。

50滴定を行った。

A. 8日目にHIVに関して陽性を示した培養物%対ウイルスイノキュラム希釈度のプロット。

B. 4日目、8日目及び12日目のID-50(培養物の50%が陽性を示す時のウイルス希釈度の逆数)のプロット。

C. HIVの 10^{-2} 希釈物を使用した場合の、8日目にHIVに関して陽性を示した培養物%対種々のsT4濃度のプロット。

(以下余白)

第17図: 蛍光ヒストグラム(細胞数対蛍光強度)

sT4はT4⁺CEM細胞へのHIVの結合を阻止する。細胞をバッファ(---)か、sT4と共に予めインキュベートしたHIV(—)か又は非形質転換DXB-11細胞(---)からの濃縮対照上澄みと共に予めインキュベートしたHIVと共にインキュベートし、洗浄し、フルオレセイン結合抗HIV抗体に暴露し、細胞蛍光定量法によって分析した。蛍光ヒストグラム(細胞数対蛍光強度)を示す。

第18図: sT4によるHIV感染性の阻害

HIVイノキュラムの感染性滴定(ID-50アッセイ)を行った。10倍ずつ希釈した一連のウイルスイノキュラム希釈物をインジケーター細胞(PHAで刺激したヒトリンパ球)と共に18時間インキュベートする。次いで細胞を洗浄し、マイクロカルチャーでプレーティングする(培養当たり 1×10^5 の細胞、希釈物当たり10の培養)。4日目、8日目及び12日目に、抗原捕捉アッセイによって上澄みを検査し、HIVを調べた。細胞の接種の30分前にHIV希釈物に加え且つ実験の間中培養培地中に維持した $9.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ のsT4を含む媒質(●)、又は最初の18時間のイノキュラムの後で導入したsT4を含む培地(○)、あるいはsT4を含まない培地(□)(対照)中でID-

発明の詳細

本発明は、ポリペプチドを含有するヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテインと複合体を特異的に形成し得る治療薬を提供する。本発明の1つの実施態様におけるポリペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+185を含む。本発明の別の実施態様におけるポリペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+106を含む。本発明の更に別の実施態様におけるポリペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+3から約+185を含む。

更に本発明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者を治療するための治療薬として有効な医薬的組成物を提供する。この医薬的組成物は、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテインと複合体を特異的に形成し得る且つ水溶液に可溶性を示す本発明のアミノ酸配列と、医薬的に許容可能なキャリアとを含有する。かかる医薬的に許容可能なキャリアは、本発明が関与する分野では公知であり、限定的ではないが、0.01~0.1M、好ましくは0.05Mのホス

フェート緩衝液または0.8%生理食塩水を含む。

更に本発明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法を提供する。この方法は、患者に感染した免疫不全ウイルスをT4⁺細胞に感染できないようにするために、患者に、医薬的に許容可能なキャリアと、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテインと複合体を特異的に形成し得て且つ水溶液に可溶性を示す本発明のアミノ酸配列とを含有する医薬的組成物を有効量投与することからなる。

sT4タンパク質のin vitro生化学的及び免疫学的特性の特性化は、このタンパク質がAIDSの予防及び治療に価値があることを示した。研究によって、sT4タンパク質はウイルスの細胞外及び細胞から細胞への伝播の阻害剤として作用することが判った。培養において、sT4はウイルスがT4⁺標的細胞に結合するのを遮断することが判ったので、sT4を感染者に投与すると、ウイルスの細胞外伝播を阻害するように作用するであろうと考えられる。従ってsT4は、AIDS治療の予防薬及び治療薬の両方として価値がある。

予防薬としてのsT4は、この病気に対して高い危険性を有する個体、またはウイルスに対する抗体の存在によって

な治療薬は、ウイルス媒介の感染及び細胞から細胞への伝播を防止すべきである。更にsT4は、他の抗ウイルス剤、例えばアジドチミジン(AZT)と組み合わせて使用してもよい。

本発明のsT4タンパク質は、T4⁺細胞機能の阻害剤としての有効性も有する。多くの研究によって、免疫耐性、特に自己免疫疾患の発病及び進行並びに宿主特異的移植片拒否反応におけるCD4レセプタ(CD4はヒトT4レセプタ及び他の哺乳動物細胞におけるその該等物質に対する一般用語である)の重要な役割が示された。sT4に特に関係するのは抗CD4 Mabsを用いた観察である。これらのCD4レセプタとの会合によって、これらのMabsの特定のものは自己免疫応答及び移植片拒否反応改善する。かかる作用の例としては、T細胞in vitro機能、例えば特定の抗CD4 Mabsによる抗原誘導性増殖、リンホカイン分泌及びヘルパー細胞機能の障害、マウス狼瘡の徴候を阻害するための抗CD4 Mabsの投与による全身性狼瘡紅斑(systemic lupus erythematosus)の治療、並びに、マウスCD4レセプタに対するマウスMabを1回投与することにより同種移植が受容されるマウスにおける移植研究を挙げることができる。

HIVに暴露されたことが判る個体に投与される。病気の早期段階または徴候が現れる前に有効量のsT4を投与すると、T4⁺リンパ球のHIV感染を阻害するように作用する。治療薬としては、HIVに感染した人にsT4を投与すると、ウイルスの細胞外伝播を阻害するように作用する。

HIV感染細胞と他のT4⁺リンパ球との融合もまたウイルス伝播の経路であるらしい。更に融合は、感染個体におけるT4⁺リンパ球機能の損傷及び最終的にはT4⁺リンパ球の喪失の一部原因となり得る。細胞融合は、ウイルスエンベロープ遺伝子産生物及びT4レセプタの両方に依存し、OKT4Aまたは類似のモノクローナル抗体(Mabs)(120)によって阻害され得る。sT4は細胞融合に干渉し、従ってウイルスの細胞から細胞への伝播及びT4⁺リンパ球機能の損失を減少させることが期待される。

T4レセプタは同一構造であって、sT4は、全てのHIVを含む、T4レセプタの表面ドメインを認識するウイルスの共通の阻害剤であると思料される。

sT4は他の薬剤と組み合わせて、例えば逆転写酵素、プロテアーゼまたはtatのごとき他のHIVタンパク質に対する薬剤と共同して使用することができる。HIVに対する有効

MabがCD4に結合した結果の分子は明確ではないが、MabsはCD4とその配位子との会合を遮断することができる。この配位子はMHCクラスII抗原(121,122)における保存エピトープであることが立証されている。しかしながら、これらの同じMabsの少なくとも幾つかは、見掛けのクラスII独立経路によってCD4細胞活性化を阻害する。

更にsT4は、恐らく、通常はT4レセプタの表面ドメインと相互作用する細胞外膜の分子に結合することにより、T4細胞の拮抗物質としてT細胞相互作用を阻害すると思料される。MabsとsT4との区別は、重要な機能血結果をもたらした。例えば、T4に対する幾つかのMabsはT4細胞において応答を引き出す一方、sT4は、MHCクラスII抗原を発現する細胞において応答を引き出すことができる。また、T4のその推定クラスII配位子に対する親和性は、T4に対するMabsの親和性が高いのと比較すると極めて低いようである。従って、Mabs及びsT4は同じ過程に干渉し得るが、異なる標的分子及び異なる標的細胞に影響を及ぼす。

予防薬または治療薬として、T4は経口、好ましくは静脈内投与される。薬剤は、点滴または注射によって、例えば毎日、毎週または毎月投与することができる。sT4投与

の量及び割合は、血液中に有効量のsT4が維持されるように選択される。別の投与形態としてはsT4を透析剤として使用する体外投与がある。

更に本発明のsT4タンパク質は、T4⁺細胞相互作用の治療薬または阻害剤として作用する天然、合成または組換え分子に対する試薬として使用することができる。

例えば、sT4タンパク質は、T4レセプタの表面ドメイン相互作用の拮抗物質を分析するための他の試薬と組み合わせて使用することができる、生化学的に純粋な水溶性試薬を提供するための、ELISAに基づく方法によって測定されるタンパク質相互作用の分析といったふい分け分析に使用することができる。例えば、sT4はHIV env タンパク質又はHIV env タンパク質を含有する混合物に結合するので、これは、ウイルス結合の阻害剤のふい分けに使用することができる。sT4がHIV env タンパク質を発現する細胞に結合することを示す in vitro データに基づき、sT4も、HIV in vivo 感染細胞に対する選択的標的分子として作用することができる。標的特定のキャリアタンパク質として、sT4は、例えば、感染細胞に対する細胞障害剤の分配のためのキャリアタンパク質として作用することができる。

宿主は細菌細胞である。本発明の別の実施態様においては細菌細胞は Escherichia Coli 細胞である。本発明の更に別の実施態様においては適当な宿主は真核細胞である。本発明の更に別の実施態様においては、真核細胞は哺乳動物細胞である。本発明の更に別の実施態様においては真核細胞は酵母細胞である。本発明の更に別の実施態様においては適当な宿主は昆虫細胞である。

更に本発明は、T4レセプタの予測される細胞外ドメインで構成されるsT4を生産する手段を提供する。T4 cDNAのT4レセプタのリーダードメイン及び細胞外ドメインをコードする部分、即ち前sT4を使用し、哺乳動物においてsT4を過剰発現(overexpression)できるベクターが構成される。1つのsT4の配列は以下の通りである。

更にT4レセプタが、T4⁺細胞のクラス制限によって示されるような抗原提供細胞におけるMHCクラスII抗原と特異的に会合することを示すデータに基づき、T4のリンパ球-標的細胞相互作用の阻害剤をテストするために、sT4をクラスII抗原と組み合わせて使用することができる。sT4とその標的分子との間の直接結合分析に基づいた上記例に加え、sT4認識に対する生化学的応答に依存するより複雑な分析を行なうことができる。

更に本発明は、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを提供する。本発明の別の実施態様においては、発現ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+106を含むポリペプチドをコードする。本発明の更に別の実施態様においては、発現ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードする。

更に本発明は、本発明の発現ベクターを含有する宿主細胞を提供する。本発明の1つの実施態様においては適当な

670	680	690	710	720	730
AAA ATA GAC ATC GTG GTC CTA GCT TTC CAG AAG GGC TCC ACC ATA CTC TAT AAG AAA GAG Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu					
730	740	750	760	770	780
GGC GAA CAG GTG GTC TCC TTC CCA CTC GGC TTT ACA GTT GAA AAG CTG ACC GGC ACT Gly Glu Gln Val Asp Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser					
790	800	810	820	830	840
GGC GAG CTG TGG TGG CAG GGC GAG AGG GCT TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC Gly Glu Leu Trp Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser					
850	860	870	880	890	900
CTG AAG AAC AAG GAA CTG TCT CTA AAA CCG CTT ACC CAG GAC CCT AAG CTC CAG ATG GGC Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly					
910	920	930	940	950	960
AAG AAG CTC CCG CTC CAG CTC ACC CTC GGC CAG GGC TTT GCT CAG TAT GCT GCT GCT GCT Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly					
970	980	990	1000	1010	1020
AAC CTC ACC CTC GGC CTT GAA GCG AAA ACA GGA AAG TTG CAT CAG GAA CTC AAC CTG GTG Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GTG ATG AGA CCG ACT CAG CTC CAG AAA AAT TTG ACC TGT CAG GTG TGG GGA CCG ACC TGC Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGT AAG CTG ATG CTG AGC TTG AAA CTG GAG AAC AAG GAG GCA AAG CTC TCC AAG CCG CAG Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
AAG CCG GTG TGG CTG CTC AAC CCT CAG CCG GGG ATG TGG CAG TGT CTG CTG AGT GAG TCG Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GGA CAG GTG CTC GAA TCC AAC ATC AAG GTT CTG CCG ACA TGG TCC ACC CCG GTG TAA Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val					
1270					
TGG CCG CTC TAG A					
10	20	30	40	50	60
CAG GGC CAG GGC GCT GCT ATT TCT GTG GGC TCA GCT CCG TAC TCC TCA CCG CTT TCC TTC					
70	80	90	100	110	120
CTC GGC AAG GGC ACA ATC AAC CCG GGA GTC CTT TTT AGG CAC TTG CTT CTC GTG CTA CAA Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Val Leu Gln					
130	140	150	160	170	180
CTG GGC CTC CCA GCA GCA GCT CAG GGA AAG AAA GTG CTG GGC AAA AAA GGG GAT Leu Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Val Val Leu Gly Lys Gly Asp					
190	200	210	220	230	240
ACA GTG GAA GTG ACC TCT ACA GCT TCC CAG AAG AGC ATA CAA TTC CAC TGG AAA AAC Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn					
250	260	270	280	290	300
TCC AAC CAG ATA AAG ATT CTG GGA AAT CAG GGC TCC TCC TTA ACT AAA GCT CCA TCC AAG Ser Asn Gln Ile Lys Ile Lys Glu Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys					
310	320	330	340	350	360
CTG AAT GAT CCG GCT CAG TCA AGA AGC CTT TGG GAC CAA GGA AAC TTC CCG CTC ATC Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile					
370	380	390	400	410	420
ATC AGC AAT CTT AAG ATA GAA CAC TCA GAT ACT TAC ATC TGT GAA GTG GAC CAG AAG Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys					
430	440	450	460	470	480
CAG GAG GTG CAA TTG CTA GTG TTC GGA TTG ACT GGC AAC TGT GAC ACC CAG CTC CTT CAG Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln					
490	500	510	520	530	540
GGC CAG AGC CTC ACC CTC ACC TTG CAG AGC CCG CCG CCG CCG TCA CTC CAA TGT Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys					
550	560	570	580	590	600
AGG ACT CCA AGC GGT AAA AAC ATA CAG GGC GGC AAG ACC CTC TCC CTC TCT CAG CTC CAG Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu					
610	620	630	640	650	660
CTC CAG CAT ACT GGC ACC TGG ACA TGC ACT GTC TTT CAG AAC CAG AAG GTC GAG TTC Leu Ala Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Val Glu Phe					

sT4用コーディング配列は、例えば公知のDNA配列を使用する遺伝子の合成、配列に基づく標準クローニング技術及びタンパク質の探知による再単離、即ちcDNAクローンのT4発現細胞系からのトランスフェクション及びタンパク質に対する抗体による識別により得られる。sT4コーディング配列を担うcDNAクローンはオリゴヌクレオチドハイブリゼーションプローブの使用により識別される。プローブはT4タンパク質の公知の配列に基づき設計されている。sT4コーディング配列を担うクローンを識別したコーディング配列は制限エンドヌクレアーゼを使用して削除され (excised)、クローニング及び／又は発現ベクターに挿入される。発現ベクターでは、sT4コーディング配列はコーディング配列の転写、翻訳及び処理に必要な又は所望される調節機能に有効に (operatively) 結合されている。

調節機能は、例えば転写配列のポリアデニレーション及び増進のような他の機能と同様に、RNAポリメラーゼ結合及び転写に必要な機能を含んでいる。プロモーターは、例えば発現が形質転換クローンの転写及び選択後まで誘発されないように調整し得る。本発明の実施に有効なプロモーターは例えばSV40初期プロモーター及びラウス肉種ウイルス

シコホルミシン (oxycoramydin) 耐性) 用遺伝子を含んでいる。

哺乳類の細胞での転写及び翻訳の後に、リーダー配列が開裂して現れ、成熟T4がならし培地内に生成される。

本発明の好ましい実施例では、sT4ミニ遺伝子は人間のH-ras又はマウスのジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) のミニ遺伝子に結合されて発現ベクターを作製する。

sT4ミニ遺伝子は、例えば選択マーカー及びこれらの遺伝子とのコトランスフェクションを通じて遺伝子発現を選択的に増幅する手段を提供するために、人間のH-ras又はマウスのDHFRに結合されている。共通の選択マーカーは、例えば問題の遺伝子の単一コピーと同じように少ない組み込みのために選択するDHFR、G418又はハイグロマイシンを含んでいる。例えばDHFR系のメトトレキセート (mtx) との増幅の結果、遺伝子が過剰発現する。

遺伝子の増大した発現の代替手段は、rasプロト-腫瘍遺伝子の使用を含んでいる。ras遺伝子科はH-ras、K-ras及びN-ras遺伝子を含んでいる。本発明の好ましい実施例では、H-ras遺伝子を使用する。

他のDNA機能をsT4ミニ遺伝子に直接的に若しくは非直接

ス、モロニー肉種ウイルス又はサイトメガロウイルス (CMV) のロングターミナルリピート (LTR's) を含んでいる。

転写に先立ち、sT4ミニ遺伝子、即ちT4受容体のリーダーと細胞外ドメインとをコードする遺伝子は、遺伝子選択マーカー系を含むより大きいDNA分子内に組み込まれるのが好ましい。選択マーカー系は、トランスフェクトされた宿主細胞内に検知し得る表現型変化を容易に引き起こす任意の遺伝子からなる。かかる表現型の変化は、例えばフォーカス形成又は薬剤耐性であってもよい。このような遺伝子として例えばG418又はハイグロマイシンBに対して耐性の遺伝子がある。又は、キサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (xgprt)、チミジンキナーゼ (TK) 及びガラクトキナーゼ (galK) のような他の選択マーカーがある。遺伝子増幅を可能とする選択マーカーは、トランスフェクション効率を増して、又は問題の遺伝子及び選択マーカーの細胞内複製を増進させてコピー数を増大させるために使用され得る。遺伝子のコピー数の増幅にも役立つこのようなマーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (メトトレキセート耐性)、CAD (N-ホスホニアセチル-L-アスパルテート耐性) 及びアデノシンデアミナーゼ (2-デオキシ

的に結合することができ、又はこのような機能を結合しないこともできる。Axelの米国特許第4,399,216号を参照のこと。

哺乳類細胞での遺伝子生成物の過剰発現は、一時的な又は安定した手段により行われ得る。一時的な過剰発現は、ワクシニアウイルスベクターの使用のようなウイルス方法又はSV-40複製を支持する細胞内のSV-40ベースのベクターを使用するような遺伝子増幅方法により行うことができる。これらの方法は最終的に細胞の死につながる。安定した過剰発現は、マルチプル遺伝子コピーの世代、例えば遺伝子増幅用選択又はrasプロト-腫瘍遺伝子の使用を通じて行われ得る。

H-ras遺伝子系を使用するコトランスフェクションによるsT4タンパク質の過剰発現は、多くの異なる細胞系を使用して行われ得る。好ましい細胞系は接触阻止したマウスの繊維芽細胞の細胞系であるN1B-3T3細胞系である。他の細胞系は正常ラットの腎臓 (NRK) (ATCC 1571) の細胞系及びラットの胚の繊維芽細胞52 (REF-52) の細胞系 (115) を含んでいる。

選択マーカー系、例えば遺伝子コピー数の増幅が選択的

増幅により行われるメトトレキセートを有するDHFR(DHFR/MTX技術)を使用するとき、中国のハムスターの卵巣の細胞系(C80)が好ましい。特に、DHFRの欠如したC80細胞が使用される(116)。使用し得る他の細胞の型は、例えばDHFRになるように変えられた任意の哺乳類の細胞を含んでいる。

あるDHFR⁺細胞の型は、メトトレキセートに対して正常DHFR(Axel, 米国特許第4,399,216号)ほど感受性のない突然変異DHFR遺伝子と組み合わせて使用し得る。一般に、DHFR⁺細胞は正常DHFR遺伝子及び付加的優性選択可能遺伝子例えばG418耐性遺伝子(117)を使用し得る。トランスフェクションは標準技術を使用して実施する(118,119)。これらの技術は、例えばリン酸カルシウム沈降、DEAE-デキストリン誘発ピノサイトシス、エレクトロポレーション及びウイルストランスフェクションを含んでいる。

トランスフェクションの後に、選択可能な遺伝子の増幅を可能とする条件下で、sT4ミニ遺伝子を担う細胞を普通培地で培養する。標準の哺乳類細胞の培養基、例えばヒボキサンテン及びチマジンがなく10%のウシ胎児血清を含むF12培地(GIBCO, グランドアイランド、ニューヨーク)を使用し得る。細胞培養は30~45℃の常圧で維持する。選択後

本発明のsT4は、T4の細胞外ドメインの誘導体を含む。そのような誘導体は付加、欠失及び置換を含み、これらの変更はならし培地中へのタンパク質分泌及びタンパク質のHIV *env*タンパク質即ちgp120への親和性に基だしい悪影響を及ぼさない。例えば、1個または数個のアミノ酸をN末端またはC末端に付加し、またはこれらの末端から除去し得る。あるいはまた、1個または数個のアミノ酸、好ましくは4個未満のアミノ酸を内部アミノ酸に挿入し、内部アミノ酸から除去し、または内部アミノ酸と置換し得る。他の場合には、sT4とタンパク質キャリア、別の抗原または他のsT4分子との間にハイブリッドタンパク質即ち融合体を形成してポリsT4分子を実現することも可能である。更には、sT4はキャリア分子に合成的に結合させ得る。

sT4誘導体の一例を後出の実施例に示す(実施例3参照)。sT4のHIV *env*親和性は、既知の親和性を有するsT4分子を用いるかまたはOKT4及びOKT4AのようなT4レセプターを識別する抗体を用いる競合的結合測定法によって指示することができる。有用な本発明の誘導体sT4分子は、実施例3に示したようにOKT4Aによってならし培地から選択的に析出させることができる。誘導体は発現後化学的に、またはリ

生き残り、また高レベルのsT4タンパク質を発現する細胞は、更に培養を行うために選択される。このような細胞を選択的条件下で培養し、製品であるsT4タンパク質を採取して精製する。

本発明の実施例で使用し得る細胞培養方法は、例えば付着細胞の使用又は浮遊させた細胞の培養を含んでいる。ならし培地(CM)は浮遊させて又は固形支持体に付着させて培養した細胞から採取することができる。即ち、CMは回転瓶で又は固形支持体で成長させ、また浮遊させて又は流動体化した若しくはバックしたベッドで培養した付着細胞から準備する。CMは攪拌したタンク容器の浮遊細胞から準備する。

(以下余白)

ーダー及び/または細胞外ドメインのためのコーディング配列を操作することによって発現前に遺伝学的に製造し得る。

本発明のsT4は使用済み培地から、様々なタンパク質精製技術、例えば親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーを用いて精製し得る。

sT4は通常の基特異的吸着剤、例えば炭水化物結合リガンドまたは染料親和性リガンドを用いるか、またはsT4と特異的に結合するリガンド、例えばモノクローナル抗体またはHIV gp120タンパク質もしくはその一部を用いる親和性クロマトグラフィーで精製できる。

精製は例えば、(1)無血清選択成長培地で細胞を成長させること、(2)ならし培地を澄清にすること、及び(3)本発明のsT4をならし培地中に存在する他のタンパク質から分離することを含む。

好ましい方法において、sT4は無血清培地から、sT4分子の物理特性に基づく一連のクロマトグラフィー操作を用いて精製する。同様のクロマトグラフィー法を用いてsT4を

血清含有培地から精製することも可能である。

sT4精製の好ましい一方法では、初めに培地をイオン交換カラム、好ましくはS-Sepharose®(スルホプロピルセファローズ)カラムに通し、このカラムはsT4と結合する一方で大部分の汚染タンパク質を通過させる。次いで、線形塩勾配を用いてタンパク質試料を溶離させる。第2のイオン交換カラムを用いる。好ましくはQ-Sepharose®(第四アミノエチルセファローズ)カラムであるこのカラムは、試料中に存在する汚染タンパク質が該カラムと結合し、一方sT4は結合せず、カラムを真塩緩衝剤から回収されるような特性を有する。最後に、残留汚染物質を除去するべく機能するゲル濾過カラムを用いる。

sT4精製の別の方法では、sT4に対するモノクローナル抗体を用いる。sT4に対するモノクローナル抗体と結合する親和性ゲル支持体に透明にした培地を通すことにより、sT4タンパク質を1操作で精製できる。sT4は抗体結合部位でカラムに結合し、一方汚染タンパク質は総てカラムを通過する。その後、sT4をカラムから、sT4タンパク質の不活性化を防ぐ条件下に溶離する。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タ

みから成るsT4は可溶性タンパク質として細胞表面物質中に分泌され、そのコンホメーションはレセプター表面ドメインの表面を模倣するように見える。即ち、sT4は詳細な構造分析、特にX線結晶学に相当である。sT4単独、または他の相互作用分子との複合形態を取るsT4の三次元構造を決定することによって、sT4に関する選択的拮抗物質及び作用物質の理論的設計のための基礎が提供される。

本発明の提供する様々なAIDS予防及び免疫法は、ここに開示した新規なタンパク質、抗体及びDNA分子が特定分子との複合体またはハイブリッドを形成し、AIDSウイルスの中和に有効な免疫学的応答を実現する能力に基づく。本発明の分子、該分子の製造方法及びAIDS治療方法は、説明のために提示したもので請求の範囲各項に規定した本発明の範囲を全く限定しない次の実験及び実施例を参照することによって更に良く理解されよう。

(以下余白)

ンパク質との複合体を特異的に形成し得る上述の治療剤のうちのいずれかを製造する方法で、治療剤の製造を可能にする適当条件下に本発明のホストベクター系を成長させること、及び製造した治療剤を回収することを含む方法を提供する。

sT4は、T4タンパク質または該タンパク質と相互に作用する分子を検出する診断測定法に用いることができる。例えば、T4及びT4'細胞並びにT4に対する抗体の定量はAIDS治療において価値が有る。

sT4はまた新規な診断試薬、例えば標準的な免疫測定法、即ちELISA、捕獲イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ用のMabまたは他の種類の分子の発現に用いることもできる。sT4は、OKT4、OKT4A、及びT4レセプターの他の表面エピトープのほとんどかまたは総てを指示するので、系中のT4レベルの絶対的定量に適用できる免疫診断測定法で特に有用である。現在、T4レセプター定量のための基準は無い。

T4レセプターは、三つの異なる化学的環境、即ち酸化親水性細胞表面、疎水性膜、及び還元親水性細胞質に存在する。これらの異なる環境がレセプターの、その完全な自然状態での単離を防止すると考えられる。細胞外ドメインの

材料および方法

細胞および抗体

Ficoll Hypaque密度勾配遠心分離によって単離した末梢白血球はヒツジ赤血球細胞ロゼット陽性(E^+)細胞に分離した。この E^+ 集団内の $T4^+$ サブセットと $T8^+$ サブセットを、抗-T8抗体と、アフィニティー精製ウサギ抗-マウスIgG(10)に結合したヒト赤血球を用いたT8担持細胞の陽性選択によって単離した。これらのサブセットをサイトフルオロメトリーで分析したところ、 $T4^+$ 細胞は $T4^+$ が95%、 $T8^+$ が2%で、 $T8^+$ 細胞は $T8^+$ が95%、 $T4^+$ が2%であることが示された。

Fro 2.2 Tセルライン($T3^+$ 、 $T4^+$ 、 $T8^+$ 、 $T11^+$)は、未分化型急性白血病の成人患者から得た。Jurkattは $T3^+$ 、 $T4^+$ 、 $T8^+$ 、 $T11^+$ であり、RPMI 8402は $T3^+$ 、 $T4^+$ 、 $T8^+$ 、 $T11^+$ である。OT-CLLは慢性的リンパ性白血病であり、 $T3^+$ 、 $T4^+$ 、 $T8^+$ 、 $T11^+$ である(22)。 $T4^+$ セルラインのCEMとMolt 4はAmerican Type Culture Collectionから入手した。白血病Tセルラインはすべて、5%ウシ胎児血清を含有するRPMI 1640培地で連続的に増殖させた。形質転換したBセルラインCB、CP58およびCP94は既に

記載されている(23)ようにして得た。

アフィニティー精製したウサギ抗マウスIgGは塩化クロム法(24)によってヒト赤血球に結合した。

L細胞とNIH 3T3細胞の同時形質転換

ネズミLtk⁺aprt⁺細胞は、10%ウシ血清(Gibco)と50μg/μlジアミノプリン(DAP)を補充したDulbecco変性Eagle培地(DME)中に維持した。L細胞を、形質転換の1日前に10cmの皿毎に5×10⁴の細胞密度でプレートアウトした。リン酸カルシウム沈澱物は、Wiglerら(26)によって改変されたGrahamとvan der Ebの方法(25)により、皿当たり100 ngのpTXと20μgの高分子重T細胞またはL細胞DNAを用いて調製した。次の日、L細胞を10%ウシ血清、15μg/μlヒポキサンチン、1μg/μlアミノプテリンおよび5μg/μlチミジンを含むDME(HAT培地(27))中で選択下に配置した。tk⁺形質転換体は、12~14日のHAT選択の後ロゼットアッセイを用いてスクリーニングした。

ネズミNIH 3T3細胞は、10%新生ウシ血清(Gibco)を補充しDME中に維持した。NIH 3T3細胞を、形質転換の2日前に10cmの皿毎に5×10⁴の細胞密度でプレートアウトした。これらの細胞に、10μgのキャリアーDNAならびに10μgのT4-pMV6tk/

(5×10⁶)を適当に希釈したOKT[®]4、OKT[®]8またはコントロール抗体と共にチューブに入れた。この細胞-抗体混合物を4℃で45分間インキュベートした後cytowashで二回洗った。細胞にフルオレセインイソシアネート(FITC)結合ヤギ抗マウスIgG+A+M(Cappel)を加え、4℃で1時間インキュベートした。次いで、細胞をcytowash中で三回洗い、0.01%ナトリウムアジドを含むPBS 0.5 μl中に再懸濁した。この細胞をBecton Dickinson FACS IVセルソーターで分析し、データをためてVAX 11/780コンピューター(Digital Equipment Co.)を用いてプロットした。

RNAとDNAの単離

細胞を4Mチオシアン酸グアニジニウム中でホモゲネーションして全RNAを単離した後、5.7MのCsCl溶液を通して超遠心した(28)。オリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィー(Type 3, Collaborative Research)(29)によってポリ(A)⁺を選択した。Wiglerら(26)により記載されているようにして高分子量のゲノムDNAを調製した。

cDNAおよびゲノムライブラリー

ヒト末梢T細胞から得たポリ(A)⁺RNAから二本鎖

neoまたは10μgのT4-pVcos7および500 ngのpSV2neoを用いてリン酸カルシウム沈澱物を適用した。2日後、これらの細胞を10%ウシ血清と500 μg/μlのG418(Geneticin[®], Gibco)を含むDME中で選択下に配置した。選択培地中で1週間増殖させた後生き残るコロニーに対してロゼットアッセイを実施した。

ロゼットアッセイ

プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で一回すすいだ後、そのプレートを、5%ウシ胎児血清を含有するPBSに1/500に希釈した精製モノクローナル抗体OKT[®]4A(1μg/μl)2.5 μlと共に室温で45分間インキュベートした。このプレートをPBSで三回穏やかにすすいで遊離の抗体を除いた。精製したウサギ抗マウスIgG抗体に結合したヒト赤血球(2% v/vストック懸濁液、PBS/5%ウシ胎児血清中に1/10に希釈)6 μlを加え、そのプレートを室温に放置した。45分後、ロゼット陽性コロニーの検査に先立って遊離の赤血球を穏やかに吸引し、PBSを加えた。

サイトフルオロメトリー分析

接合性細胞をPBS中の0.005 MのEDTAで取出し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)と0.01%ナトリウムアジド(cytowash)を含有するPBSで一回洗った。0.1 μl中の細胞

のcDNAを合成した(20)。EcoRIメチラーゼとT4 DNAポリメラーゼで処理した後、二本鎖のcDNAをEcoRIリンカーを用いてλgt10(30)のEcoRI部位にクローン化した。Charon 4ヒトゲノムライブラリーは、Tom Maniatis博士(Harvard University)(31)から寛大に分与して戴いた。

一部を切取ったcDNAプローブの合成

Davisら(32)により記載されているようにして、初期形質転換体LTD-4から得たポリ(A)⁺RNAから³²Pで標識されたcDNAを合成した。このcDNAを過剰の未形質転換L細胞のポリ(A)⁺RNA(ロット-3000)に対してアニリングした後、ヒトcDNAに富んだ一本鎖の配列をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー(32)によって単離した。この一部を欠く(subtracted)cDNAプローブをフィルターハイブリダイゼーションにかける前にsec-ブタノールで濃縮し、TEで平衡化したG-50 Sephadexカラムで脱塩した。

cDNAおよびゲノムライブラリーのスクリーニング

ヒト末梢T細胞ライブラリーをE. coli C600/HFL上に播き、ヒトゲノムライブラリーをE. coli LE392上に播いた。ふたつ(duplicate)のフィルターを標準法(33)に従ってスクリーニングした。この際、ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド

および $5 \times \text{SSC}$ 中で 42°C で行なった。この cDNA ライブラリーのスクリーニングにおいて、 $137 \text{ } \mu\text{m}$ ニトロセルロースフィルター当たり $6 \times 10^4 \text{ cpm}$ の一部を欠くブローブを適用した。ゲノムライブラリーから得たフィルターをニック翻訳した (34) cDNA 挿入物にハイブリダイズした。 68°C で洗浄し、最後に $0.2 \times \text{SSC}$ で洗浄した。増感スクリーンを存在させて -70°C で 1~2 日オートラジオグラフィーにかけた。

DNA 配列決定

pT48 の制限断片を M13 ベクター mp18 および mp19 (35) 中にサブクローン化した。配列決定反応はジデオキシチンターミネーション法 (36) を用いて行なった。配列決定の方策 (strategy) を第 3 図に示す。

Southern および Northern プロット ハイブリダイゼーション

高分子量の細胞 DNA を、製造業者 (Boehringer Mannheim) の推奨するところから従って DNA $1 \mu\text{g}$ 当たり 5 単位の制限ヌクレアーゼで消化した。サンプル ($10 \mu\text{g}$) を 0.8% アガロースゲル上で電気泳動にかけた。DNA 断片を Gene Screen (New England Nuclear) (37) に移し、Church と Gilbert (38) により記載されているようにしてハイブリダイズした。

RNA を 0.8% アガロース-ホルムアルデヒドゲル (39) 上に

ルメチルスルホニルフルオリド (Sigma) を含有する 10 mM の Tris (pH 7.4)、 150 mM の NaCl (TBS) 中に可溶化した。溶解物を $100,000 \times g$ で 1 時間遠心し、上清を Hedoら (42) の手順に従ってレンズ豆レクチンクロマトグラフィー (Pharmacia) にかけた。溶離液を、コントロールのマウス腹水およびプロテイン A-セファローズ (Pharmacia) の混合物を用いて一回 4°C で 1 時間、そしてプロテイン A-セファローズだけを用いて二回 4°C で 1 時間予備吸着させた。次に、各上清のうち $2.5 \times 10^4 \text{ cpm}$ を $10 \mu\text{l}$ のモノクローナル抗体 (約 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) およびプロテイン A-セファローズと混合し、ターンテーブル上で 4°C で一晩インキュベートした。次いで、ビーズを 0.5% の NP-40 と 0.2% の SDS を含有する冷 TBS で四回洗い、電気泳動サンプルバッファー中に再度懸濁した。

ゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli (43) の手順に従って実施した。免疫沈降物と in vitro 翻訳産物を 2-メルカプトエタノールを含むかまたは含まないサンプルバッファー中に溶かした後、 10% ポリアクリルアミドゲルにかけた。オートラジオグラフィーは、増感スクリーン (DuPont Chemical Company) の存在下で Kodak XAR-5 フィルムを用いて行なった。

液し、GeneScreenに移した。Northernハイブリダイゼーションは製造業者の提供する手順に従って実施した。SouthernプロットもNorthernプロットもニック翻訳したブローブにハイブリダイズした。

SP6 RNA の合成および In Vitro 翻訳

kb の T4 cDNA を pSP65 (Promega Biotec) の EcoRI 部位にサブクローン化し、Hind III で線状化した。放射標識したヌクレオチドを存在させずに SP6 ポリメラーゼを用いた線状化したプラスミド DNA ($1 \mu\text{g}$) を転写するには既に記載 (40) の通りにしたが、転写バッファーには GpppG と未標識の CTP を添加した。反応混合物の $1/10$ を、L- $[^{32}\text{S}]$ -メチオニン (Amersham) と $1 \mu\text{l}$ の S-アデノシルメチオニンを含有する変芽系 (Bethesda Research Laboratories) で翻訳した。この in vitro 翻訳産物を下記の還元条件下で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。

細胞標識、レクチンクロマトグラフィーおよび免疫沈降

既に記載 (41) されているようにして、 10% の透析したウシ血清と $1 \mu\text{Ci}$ の L- $[^{32}\text{S}]$ -メチオニン (Amersham) を含有しメチオニンを含まない DME 培地中で 12 時間細胞を増殖させた。この細胞を、 0.5% Nonidet P-40 (Shell) および 0.2 mM フェニ

同時形質転換およびロゼットアッセイ

マウス ψ -2 細胞 (44) は、 10% ウシ血清 (CS) (Gibco) を補充した Dulbecco の変性 Eagle 培地 (DME) 中に維持した。 ψ -2 細胞は、形質転換の 2 日前に 10 cm の皿当たり 5×10^5 の細胞密度でプレートアウトした。リン酸カルシウム沈降物は、Wiglerら (27) によって改変された Graham と van der Eb の方法 (25) によって調製した。 $10 \mu\text{g}$ のキャリアー DNA および $10 \mu\text{g}$ の T4-pHVT または $10 \mu\text{g}$ の T8-pHVT を用いて沈降物を細胞に適用した。2 日後、これらの細胞を DME/ 10% CS と $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G418 (Geneticin[®], Gibco) 中で選択下に配置した。

T_4^+ 又は T_8^+ コロニーを同定するための Rosetting アッセイは、特定培地中での生育から1週間後生存コロニーで実施した。リン酸緩衝食塩液 (PBS) を用いて1回リンスした後、プレートを5%ウシ胎児血清 (FCS) 含有PBS中で1/500希釈した精製モノクローナル抗体OKT[®] 4A又はOKT[®] 8 (1 μ g/ml; Ortho) 2.5 mlと一緒に室温で45分間インキュベートした。プレートをPBS中で3回やさしくリンスして、遊離の抗体を除去した。精製ウサギ抗-マウスIgG抗体 (2% v/v ストック懸濁液、PBS/5% FCS 中で1/10希釈) を接合したヒト赤血球を添加し、プレートを室温で放置した。45分後、遊離の赤血球をゆっくり吸引し、検査の前にPBSを添加した。 T_4^+ 及び T_8^+ ϕ -2 クローンをコロニー単離により精製し、その特性をフローサイトメトリー及びノーザンブロット分析により調べた。

組換えレトロウィルスの産生及び感染

10^5 cfu/ml の力価を有する組換えレトロウィルスストックを産生する T_4^+ 又は T_8^+ ϕ -2 クローンを単離した。ウィルスストックを、 T_4^+ 又は T_8^+ ϕ -2 クローンの近融合性 (near confluent) 単層に新鮮なDME/10%CS 10mlを添加

して作成した。24時間後、培地を取り除き、0.45 μ m フィルター (Millipore) を用いて濾過した。感染のために、 5×10^5 細胞を、8 μ g/ml polybrene (Aldrich) の存在下でウィルス上清 (又は希釈液) 2 mlと一緒にインキュベートした。3時間後、新鮮な培地3mlを添加した。感染から3日後、細胞を500 μ g/ml G418 含有DME/10%CSに再接種し、2週間生育させ、G418^r コロニーを計数し、*in situ* rosetting 法又はフローサイトメトリーを用いて表面 T_4 又は T_8 発現について調べた。

ϕ -2 培養上清を用いて、上記したマウス ϕ -AM細胞を感染した。 T_4^+ 又は T_8^+ 粘着トランスフォーマントを、*in situ* rosettingアッセイ後コロニー単離により精製した。

T_4^+ 又は T_8^+ 非粘着性トランスフォーマントを、フルオレセンス励起セルソーティング (FACS) により精製した。非粘着性ヒトリンパ球細胞系 (HSB2, RPMI-T細胞, Raji-B細胞) 及び粘着性上皮細胞 (HeLa) を、 T_4^+ 又は T_8^+ ϕ -AMクローン (10 μ g/ml マイトマイシン-Cで2時間予備処理、Sigma) と共培養して感染させ、精製した。

細胞系を1.5 μ g/mlの濃度でのG418耐性について選択した。

但し、HeLa細胞では1 μ g/ml、腺癌細胞については0.5 μ g/mlとした。組換え両性ウィルス (4-AM) を産生する全ての細胞培養物をP3拘束条件下で保持した。

ALVウィルス

HTLV-III/LAVのプロトタイプLAV菌株をJ.-C. Cherman (Institut Pasteur, Paris; (45)) から入手した。本研究で使用したウィルス接種物は、我々の実験室の第2〜第5継代ウィルス由来のものであった。接種物は、HTLV-III/LAV-感染植物性血球凝集素 (PHA) -刺激末梢白血球 [逐次遠心 (300 \times g で7分間実施した後1500 \times g で20分間実施) により集めた] の培養上清であり、液体窒素中で保存した。結合研究のために、ウィルスを、上記の如く90,000 \times g で90分間の超遠心により集めた培養上清から0.01M Tris, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, pH8.0 中のRenograffin (E.R. Squibb) 15% クッションを用いて濃縮した。

抗-HTLV-III/LAV試薬

HTLV-III/LAVに対する抗体を多く含む血清を慢性リンパ症候群を患っているホモの男性から得、蛍光抗体法(48)、ウェスタンブロット分析(47)及び放射免疫沈降(48)によりその

特異性を調べた。1 g G分画の一部を、上記した如く (47, 49, 50, 51) フルオレseinイソチオシアネート (FITC: FITC; たんぱく質比-10.7 μ g/ml)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HPO, タイプVI, Sigma) 及びアガロースとカップリングさせた。非免疫血清からのIgG接合体も平行して作成した。

逆トランスクリプターゼアッセイ

Mg 依存の粒子逆トランスクリプターゼ (RT) 活性を、7.5 mM Mg²⁺ (52) の存在下で (A)_n (dT)₁₂₋₁₈ [負のコントロールとして ()_n (dT)₁₂₋₁₈] の鋳型プライマーを用いて測定した。

細胞質ALVウィルスのけい光抗体検出

培養細胞 (0.1 ml 中 1×10^5) をガラススライド上で遠心し (Shandon cytocentrifuge)、95%エタノール-5%酢酸中-20℃で30分間固定し、PBS (0.01M PO₄, 0.15M NaCl, pH8.0) を用いて10分間3回再水和した。スライドをFITC-抗HTLV-III/LAVの1/500希釈液 (19 μ g/ml) に室温で30分間露した。次いで、スライドを洗浄し (10分間 \times 3)、PBS中50%グリセロールを用いてカバース

リップの下に設置した。630 × パワーの落射照明のLaitz orthoplan 顕微鏡で、スライドを検査した。これらの条件下で、F I T C - 抗 H T L V - III / L A V 試薬は H T L V - III / L A V に対して特異である。非感染の P H A 刺激細胞、Epstein Barr (E B) ウィルス感染 B 細胞系、アデノウィルス感染細胞系、T 細胞系並びに H T L V - I 及び H T L V - II 感染細胞系は染色されなかった。

D A I 感染ウィルス免疫アッセイ (抗原捕捉アッセイ)

感染 H T L V - III / L A V の力価測定のための微小培養アッセイは(47)に詳記されている。概略的には、P H A - 刺激リンパ球又は細胞系 (2×10^6 細胞/ml) をウィルス接種物の連続 10 倍希釈により接種し、37℃ で 18 時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、微小培養物 (希釈あたり 10~20 カルチャ; 0.25 ml 培地中のカルチャあたり 1×10^5 細胞) 中にプレートした。4 日毎に、上清 100 μ l を取り除き、新鮮な培地と取り換えた。次いで、上清を、上記した如き抗原捕捉アッセイによりウィルス抗原についてアッセイした。感染ウィルス価 (I D - 50) は、培養物の 50% がウィルスに対して陽性を示す希釈のレシプロカルとして定義される。

(54)に記載されている如く細胞を予処理してから 30 分後シュードタイプを添加することによりシュードタイプブランクの形成を抑制した。

シンシチウム誘発アッセイ

2×10^5 細胞を、直径 10 mm のウェルにおいて H T L V - III (55)により感染かつ H T L V - III を産生する 2×10^4 H 9 細胞と一緒に共培養した。培養物を 37℃ でインキュベートし、前記した如く (54, 56) 18 時間後にシンシチウム形成について調べた。5 個もしくはそれ以上のシンシチウムを含む細胞を正と判定した。接種時に混合培養物に抗- T_4 モノクローナル抗体 (1:20) を添加してシンシチウム抑制を調べた。

細胞けい光分析及び A I D S ウィルス結合

方法は(46)に詳説されている。概略的には、フルオレセイン接合抗- T_4 ^A又は抗 T_8 ^Bモノクローナル抗体 (O K T[®] 4 A, O K T[®] 8) を用いる直接けい光抗体法により、細胞表面 T_4 又は T_8 発現を検出した。希釈/洗浄バッファは、0.1% 牛血清アルブミン、2% v/v A B⁺ ヒト血清及び 0.01% N a N₃ を含む 0.01M P O₄, 0.15M N a C l, pH 7.4 であった。全ての試薬を最適 (飽和) 結合のために予備滴定した。細胞

V S V シュードタイプアッセイ

水溶性口炎ウィルス (V S V, Indiana 菌株, 野生型) を、上記した如く (53) エンベロープシュードタイプに必要なレトロウィルスを産生する細胞中で増殖させた。高度免疫の中性化単抗-V S V 血清を集めた V S V に添加して、非シュードタイプウィルス粒子を不活化した。シュードタイプ価は $10^4 \sim 10^5$ P F U / ml の範囲であった。アッセイのために、V S V シュードタイプで感染させるべき 2×10^5 細胞を直径 30 mm の組織培養ウェルに導入した。H e L a, N I H 3 T 3 及び L 細胞は本来粘着性であり、他のタイプの細胞は下層を 50 μ g / ml のポリ-L-リシンを用いて予処理することにより付着した。1 時間ウィルスを吸着させた後細胞を洗浄し、各ウェルに 10^6 ミンク C C L 64 又は牛 M D S K 細胞を添加した。これらの細胞は二次 V S V 感染のための優れたブランクを提供するが、シュードタイプビリオンによる感染に対しては耐性を有している。ブランク指示細胞を固定、拡散させた後 (約 90 分)、単層を寒天培地で覆った。感染後 2 日目に、V S V ブランクをカウントした。抗- T_4 A モノクローナル抗体 (1:20)、抗-H T L V - III 血清 (1:10) 又は抗-H T L V - I 血清 (1:10) を使用し、

(5×10^5) をモノクローナル抗体希釈物 25 μ l 中 4℃ で 30 分間インキュベートした。細胞を遠心 (300 × g で 7 分間) により洗浄し、食塩液中 1% パラホルムアルデヒド 0.5 ml 中に再懸濁し、フルオレセンス励起セルソータ (F A C S IV, Becton Dickinson) を用いて分析した。H T L V - III / L A V 結合のために、 5×10^5 細胞を H T L V - III / L A V (10 μ l 中 50 ng) を一緒に 37℃ で 30 分間インキュベートした。洗浄した細胞をフルオレセンス接合抗-H T L V - III / L A V 25 μ l 中に 4℃ で 30 分間再懸濁させた。細胞を洗浄し、1% パラホルムアルデヒド中に再懸濁し、上記した如く F A C S についてアッセイした。H T L V - III / L A V 結合の抑制のために、細胞を抗- T_4 A 又は T_8 (20 μ l 中 20 ng) と一緒に 4℃ で 30 分間予備インキュベートした後 H T L V - III / L A V (10 μ l 中 500 ng) を 37℃ で 30 分間に亘り添加した。細胞を洗浄し、フルオレセンス接合抗-H T L V - III / L A V と一緒にインキュベートし、洗浄し、パラホルムアルデヒドに再懸濁し、上記した如く F A C S について分析した。

細胞表面の放射性ヨウ素化、免疫沈降及びゲル電気泳動

T_4 ^A N I H 3 T 3 トランスフォーマントの表面を、ラクト

ベルオキシダーゼ法(18)により放射性ヨウ素化した (radio iodinated)。 4×10^7 細胞を 0.5 mM EDTA、 $2 \text{ mCi Na}^{125}\text{I}$ 及び $20 \mu\text{g}$ のラクトベルオキシダーゼを含む PBS 1 ml 中に懸濁した。0, 1, 5, 10 及び 15 分目に $0.03\% \text{ H}_2\text{O}_2$ $10 \mu\text{l}$ を添加した。反応を 23°C で実施し、 10 mM NaI を含む冷 PBS 50 容量中で 2 回遠心することにより 20 分目に反応を停止させた。標識細胞を 4 本のチューブに分け、HTLV-III/LAV ($20 \mu\text{l}$ 中 $2 \mu\text{g}$) と一緒に 37°C で 30 分間インキュベートした。続いて、 $0-4^\circ\text{C}$ で洗浄し、検査した。洗浄した細胞を、洗浄溶解バッファ (LB; 0.2 mM フェニルエチルスルホンフルオリド、 $5 \mu\text{g/ml}$ アプロチニン、 ~~0.02 M コーニールスルホンフルオリド、 $5 \mu\text{g/ml}$ アプロチニン~~ 0.2 mM EGTA、 0.2 mM NaF 、 0.2% デオキシコール酸ナトリウム及び 0.5% (v/v) Nonidet P-40 含有 0.02 M Tris、 0.12 M NaCl 、 $\text{pH} 8.0$) 1 ml を添加して溶解させた。チューブを氷上で 15 分間保持し、 $3000 \times g$ で 20 分間遠心して核を除去した。

吸収処理用に、ヒト抗 HTLV-III/LAV IgG、ヒト非免疫 IgG、抗 T_4 A 及び抗 T_8 抗体のセファロース結合物

(conjugate) を既述のようにして調製した(48)。分解物

(lysate) を攪拌下 1.5 時間、 $200 \mu\text{l}$ のセファロース-非免疫ヒト IgG に予備吸収させたのち、攪拌下 3 時間で $20 \mu\text{l}$ のセファロース結合物 (上記のもの) を用いて免疫析出させた。セファロース吸収物を、LB で 1 回、 0.5 M NaCl を含む LB で 1 回、そして 0.1% のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む LB で 1 回の合計 3 回洗浄した。吸収物質を 65°C にて 30 分間、 $20 \mu\text{l}$ のサンプルバッファ (0.01 M トリス、 $\text{pH} 8.0$; 2% SDS、 5% 2-メルカプトエタノール (v/v)、 $25 \mu\text{g}$ のプロモフェノールブルー及び 10% のグリセリン (v/v) を含有) により溶解した。電気泳動は、 $3.3 \sim 20\%$ のグラジエントの、 3% の結合ゲルを含むポリアクリルアミドゲルで行ない、オートラジオグラフはコダック XAR-5 フィルムを用いて現像した。

ウイルス阻害アッセイ

$2 \times 10^5 T_4^+ JM$ T 細胞を 0 分にエイズウイルスに暴露した。阻害剤である塩化アンモニウム (20 mM) 又はアマンタディン (amantadine) (20 mM) を、ウイルス感染の種々の時間に (0 分、30 分、及び 80 分) 加えた。6 時間後、細胞を洗浄し、

新鮮な媒質 (RPMI/10% FCS) で置換した。エイズ感染におけるこれらの試剤の作用を感染 5 日後に評価した。ウィルス抗原を発現する培養物中の感染細胞のフラクションを、上記のように免疫ケイ光分析法によって測定した(58)。

RNA 単離及びノーザンブロットハイブリダイゼーション

全 RNA を細胞から、 4 M のグアニジンチオシアネートにホモジナイズし、その後 5.7 M CaCl_2 クラクションを介して超遠心して単離した(28)。ポリ (A)⁺ セレクションは、オリゴ (dT)-セルロースクロマトグラフィー (タイプ 3、コラボレーティブリサーチ (Collaborative Research)) によって行なった(29)。RNA を 1% アガロース-ホルムアルデヒドゲル (39) 上で電気泳動し、ハイボンド (Amersham) 上に移した。ノーザンブロットハイブリダイゼーションを製造者からもたらされた方法に従って行なった。プローブを $\alpha^{32}\text{P}$ ラベルデオキシヌクレオチドトリホスフェートで比活性 $0.5 \sim 1 \times 10^9 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ 微生物にニックトランスレート (nick translate) した(59)。

結果

T_4 cDNA の単離

T_4 cDNA の単離に用いたストラテジーは、その表面で

T_4 を発現する L 細胞形質転換体を構築することを最初を含む。 T_4^+ 形質転換フィブロブラスト (腺癌芽細胞) の mRNA から合成された cDNA を消去的ハイブリダイゼーションにより濃縮し、外縁の Tリンホサイトの mRNA から作られた cDNA ライブラリーから T_4 をコードする cDNA を単離するためのプローブとして用いた。 T_4^+ cDNA クローンの同一性は、ノーザン及びサザンブロット分析法により、そして究極的にはこれらのクローンが T_4^+ フェノタイプをレシビエント細胞に移す能力により決定した。同様の手法は、先に、 T_8 タンパクをコードしている遺伝子を単離するために用いられている(20)。

チミジンキナーゼ (tk) 欠損マウス L 細胞を、tk を含むプラスミド、pTK (25, 26) に沿って T 細胞白血病セルライン HU T-102 からゲノム DNA と共に形質転換 (cotransform) した。T 細胞の表面タンパクを発現する tk^+ L 細胞形質転換体は、系内でのロゼッティング (rosetting) 分析により同定した。 tk^+ クローンを T_4 に対するマウスモノクローナル抗体に暴露し、その後ウサギ抗マウス免疫グロブリンとカップルした赤血球と共にインキュベートした。 T_4 形質転換形は、赤血球との特異的な結合により、赤色を呈した。このようにして、

1つの一次 T_4^+ 形質転換体、LTD-4を得た。このクローンによる T_4 分子の発現は、サイトフルオロメトリック (cytofluorometric) 分析により、独立に変化した (第1図)。

T_4^+ 形質転換体、LTD-4のmRNA分布は、新たに形質転換された遺伝子の発現においてのみ、非形質転換細胞のそれと異なるはずである。これらのシーケンスは、非形質転換細胞 (32, 60) からの大過剰のRNAと共に T_4^+ 形質転換体のポリ(A)⁺RNAから調製された高度にラジオアクティブなcDNAをアニールすることにより濃縮される。高ロット(Rot)値においてすらハイブリダイズできないcDNAをヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより単離し、lambdaクローニングベクターgt10中で構築されるヒト外縁T細胞cDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いた。4つの弱いハイブリダイズプラーク (hybridizing plaque) が同定され、プラーク精製され、 T_4 シーケンスの存在について分析された。

これらのクローンのどれが T_4 をコードするか決定するために、 T_4^+ と T_4^- 外縁(peripheral)T細胞、白血病細胞、胸腺細胞、L細胞形質転換体及び非リンホイド(nonlymphoid)細胞を用いて、ノーザンブロット分析を最初に行なった (第2

図)。4つのクローンのうち1つは、 T_4^+ 細胞中にのみ存在するRNAにハイブリダイズした。このクローンは T_4^+ 形質転換体、LTD-4中に存在する3kbRNAを検出し、また、 T_4^+ 外縁リンホサイト、多種の T_4^+ 白血病セルライン、及び胸腺細胞のポピュレーション中に存在する。非形質転換フィブロblast、 T_4^- 外縁リンパ細胞、HeLa細胞、あるいはヒトニューロblastoma (neuroblastoma)細胞からのRNAではハイブリダイゼーションは認められなかった。

このクローンにより検知されるRNAの発現パターンは、それが T_4 をコードしている可能性と一致する。しかしながら、このcDNAは単に0.6kbの長さであり、3kb mRNAにハイブリダイズする。従って、ヒト外縁T細胞cDNAライブラリーを再スクリーニングし、3kbインサートを含む1つのクローン(pT4B)が得られ、このものはサイズの的に成熟した (mature) メッセンジャーRNAに近似していた。このクローンの制限地図 (restriction map) を第3A図及び第3B図に示す。

ゲノムブロット分析

サザンブロット実験(37)を次に行ない、単離したcDNAク

ローンがヒトDNAと同様に T_4^+ 形質転換体からのDNAとハイブリダイズし、非形質転換マウスL細胞DNAとはハイブリダイズしないことを明らかにした (第4図)。種々のヒト細胞からのゲノムDNAは、BamHI酵素での開裂の後、5つのハイブリダイズしたフラグメント群を示す。予期されたように、 T_4 シーケンスが形質転換体、LTD-4中に検出することができるが、非形質転換細胞DNA中には検出できない。遺伝子(8.6kb)の3'末端に最も近いBamHIフラグメントはLTD-4中に存在せず、恐らくインテグレーションイベントの結果と思われる。さらに、リンパ様及び非リンパ様細胞からのDNAと比較すると、このような粗い分析レベルでは、全体の再配列は明らかではない。ハイブリダイズしたフラグメントの分子量の合計は33kbであり、 T_4 遺伝子が大幅大きいことを示唆している。この領域をスパンするゲノムクローンの完全なセットが得られ (下記参照)、BamHIフラグメントはこれらのクローンの制限分析によって秩序化され、遺伝子が大きくかつかなりの長さのイントロンを含むに違いないことが確かめられた。

形質転換マウス胸腺芽細胞での T_4 cDNAの発現

単離したcDNAが T_4 をコードすることは、さらにこのクローンは形質転換の後、胸腺芽細胞を T_4^+ フェノタイプに変換しうるかどうかによって実証される。染色体DNA中の T_4 遺伝子は大きく、さらにいくつかのゲノムクローンにスパン (span) する。従って、cDNAクローンを2つのレトロウィルス発現ベクター、pVcos 7およびpMV6tk/neoに導入する。これらのベクターは、単一のEcoRIクローニング部位の側にあるモロニーマウス白血病ウィルスの長い末端リピート(LTRs)を含んでいる。5'-LTRはクローニング部位を通しての転写を促進し、3'-LTRは開裂及びポリアデニレーションに必要なシーケンスを含む。ベクターpMV6tk/neoはまた、ネオマイシンホスフォトランスフェラーゼ遺伝子のコード領域に融合したtkプロモーターを含んでいる。

pVcos 7を用いる構築物 (construct) は非結合選択可能マーカーと共に形質転換することを必要とする。一方、pMV6tk/neoは、結合(linked)共形質転換を許容するネオマイシン耐性マーカーを有する。形質転換後得られるNIH3T3細胞のNeo⁺コロニーを、ネオマイシン耐性株G418を含む媒質中で成育する能力によって選択し、細胞表面での T_4 の発現を検

出するロゼッティング法を用いてスクリーニングした。

p Vcos 7 で得られた G 418 コロニーの約 50% 及び p M V 6 tk / neo で得られたコロニーの 75% がこのアッセイで T_4 について陽性であった。ロゼット陽性コロニーをさらにサイトフルオメトリーで分析して、 T_4 が形質転換細胞の表面で発現されていることを確認した (第 1 図)。

代謝タンパクラベル実験を行ない、 T_4^+ 形質転換腺癌細胞及び T リンパ細胞が同一の分子量の T_4 タンパクを発現することを明らかにした。非形質転換 NIH 3 T 3 細胞、 T_4^+ 形質転換体及び T リンパ細胞を L -[35 S]-メチオニンの存在下に 12 時間ラベルした (41)。これらの細胞を洗剤で可溶化し、溶解物 (lysate) をレンズ豆レクチンカラムに通して糖タンパクを濃縮した (42)。結合糖タンパクフラクションを溶離し、 T_4 に対するモノクローナル抗体で免疫析出 (immunoprecipitate) させた (第 5 図)。還元条件下、相対分子量 55kd で泳動する糖タンパクを、T リンパ細胞と 2 つの独立した T_4^+ 形質転換体からの抽出物中で検出する。このタンパクはコントロールである 3 T 3 腺癌細胞中では検出されない。非還元条件下では、51kd 糖タンパクが、T 細胞中及び形質転換腺癌細胞中で抗

T_4 により免疫析出される。

これらの実験から、形質転換体が抗 T_4 により免疫析出される 55kd 糖タンパクを発現し、このものはサイズの的に T リンパ細胞の表面で発現されるものと同一であることが明らかとなった。従って、単離 c DNA を用いるノーザン及びサザン分析、さらには T_4^+ フェノタイプをマウス又は腺癌細胞に付与するこの c DNA の能力の両者の結果は、T 細胞表面タンパク T_4 の全てのコードシーケンスがクローニングされたことを示している。

T_4 c DNA のヌクレオチド及び推定タンパクシーケンス

T_4 コード領域の完全ヌクレオチドシーケンスを、ジデオキシ終止法 (termination method) を用いて、3 kb c DNA インサート⁹ 両方のストランドをシーケンシングすることにより決定した (35, 36)。完全ヌクレオチドシーケンス及び予測タンパクシーケンスを第 6 図に示す。最長のオープン読み取りフレームは、開始コンセンサスシーケンス Pur N N A T G Pur によって取り囲まれたメチオニンコドン⁹ を有する部位 76 から始まる (61)。この読み取りフレーム (reading frame) は 1374 ヌクレオチドに及び、458 アミノ酸を含むポリペプチドをコードして

いる。この読み取りフレームの広がり、この c DNA を RNA 発現ベクター p S P 6 9 にインサートすることにより確認した (47)。このベクターから合成した RNA は、生体外で翻訳された場合、非修飾 (unmodified) 51kd タンパク (ヌクレオチドシーケンスから予測された正確な分子量) の合成を支配する (第 7 図)。

(以下余白)

T_4 は、リーダー配列、4 つのタンデム可変-結合 (V J) 様領域、及び膜伸展領域から成り、各部分はイムノグロブリン遺伝子族 (62, 63) の異なる構成メンバーとの対応する領域と相同性を有している (第 6 及び 8 図参照)。Kyte-Doolittle (64) 疎水性プロットにより予測されるリーダーペプチドに対応する疎水性残基の一群 (Stretch) は、開始コドンの直後に位置している。天然 T_4 タンパクがプロセス処理される正確な位置は決定することができないが、既知の開裂パターン (65) に基づくと -1 位置のスレオニンの直後で開裂が生起するものと考えられる。従って、シグナルペプチドは 23 個のアミノ酸を含有しており、プロセス処理された T_4 は 435 個の残基から成るタンパクである。

成熟タンパクの 1-94 残基部分は、イムノグロブリンの L 鎖可変領域とアミノ酸及び構造上の相同性を有している (第 9A 図)。該イムノグロブリン可変領域とこの領域との全体の相同性は 32% になる。イムノグロブリン L 鎖の V 領域と T_4 の N 末端 V 様領域 (V 1) との配列の比較から、不変残基 14 のうちの 8 残基が保存されていることが判る (66)。この領域には、2 つのシステイン残基があり、67 コのアミノ酸残基分離しており、この位

置と距離はイムノグロブリンL鎖及び隣接分子に見出される対応部分に類似している(87)。これらのシステインはV領域に特徴的な保存されている鎖間のジスルフィド結合を形成することができる。この予想は、還元条件下よりも非還元条件下の方が T_H の移動速度が大きいこと、これは少なくとも1つの鎖間結合が形成されていることを意味する、という我々の観察結果によって、支持されるものである(第5図、レーンe及びf)。

個々のアミノ酸レベルに於る相同性以外にも、 T_H のV1領域はイムノグロブリン可変領域と構造的な特徴を共有するものである。イムノグロブリンの可変及び不変領域は、連続する抗平行 β -鎖が折りたたまれた2つの β -シートを形成するという特徴的なパターンで折りたたみこまれている(87, 88)。これらの β -シートは、ジスルフィド結合及び特徴的な疎水性相互作用の両者によって、一緒になっている。 T_H のV様領域がイムノグロブリンL鎖のV領域と2次構造上でどのような相関を有しているかを決定するために、二次元構造アライメントを行った。同様に、これらの配列における予想可能な β -鎖及び β -ターンプロットもChou及びFasmanの経験的に誘導されたアルゴリズムを用いて行った。これらの分析によって、 T_H のV

様領域内に存在する7つの β 鎖の存在はイムノグロブリンV領域内に見出される対応領域と非常に良く一致していることが判る。第9A図参照。 T_H の保存された2つのシステインは β 鎖B及びF内にあり、イムノグロブリンの保存ジスルフィド結合を形成することが知られているV領域内のシステインの位置と正確に合致する。第1のシステインの12個アミノ酸分下流にトリプトファンがあり、第2のシステインの2個アミノ酸分前にはチロシンが位置する。これらの残基は、L鎖V領域の β 鎖C及びFに夫々非常に特徴的なものである。更に、アスパルテート残基が第2のシステインの6個アミノ酸分上流にあり、アルギニン残基は β 鎖Dのベースに位置する。これらの荷電残基はV領域に非常に特異的なものである。最後に、疎水性残基が β 鎖をつうじて交互に存在しており、これによって、二つの β -シートの相互作用が強化される。

T_H のV1領域の後には、イムノグロブリンの結合(J)領域及びTセル抗原レセプターと顕著な相同性を有するアミノ酸残基が続いている。第9B図において、この T_H J様領域はイムノグロブリンのL鎖のコンセンサスJ配列及びTセル抗原レセプターの二つの鎖と整列させて記載してある。このJ様領域に

続いて、統計的に重要な配列であってイムノグロブリンVJ領域のポリペプチドに構造的相同性を有する、三つの付加VJ様領域に構造的に分けることができる265個のアミノ酸配列がある。第6及び8図参照。更に、この領域には、N-結合型グリコシル化部位が二つ存在する可能性がある(Asn-Leu-Thr; 第6図)。

細胞外領域に続いて、疎水性プロット(84)による予測で可能性のある膜通過(膜通過)配列があり、この配列は、疎水性及び中性アミノ酸残基のみを含むものである。このセグメントは、II型主要組織適合抗原タンパクの β 鎖の膜通過エクソンと極めて相同性が高い(第9C図)。これらの配列をならべて比較すると、ギャップなしに48%の相同性が認められる。この膜通過セグメントに続いて、40個の高荷電性アミノが細胞質領域を構成する(第6及び8図)。

T_H 遺伝子: 染色体位置及びイントロン-エクソン位置

T_H cDNAを用いて、そのマウス-ヒト体細胞ハイブリッドのパネルにおける凝集パターン及びヒトメタフェーズ染色体とのin situハイブリダイゼーションによって、 T_H 遺伝子の染色体上における位置を分析した(101)。遺伝子プロット及び

in situハイブリダイゼーションによって、 T_H 遺伝子がヒト染色体12の短腕、12p12及び12pterの間にあることが判明した。

T_H 遺伝子を有する重複ゲノムクローン組を、ラムダクローニングベクターcharon4及びEMLB-3(31)内に構築されたヒトゲノムライブラリーをラジオ化p T_H BcDNA挿入物でスクリーニングすることによって得た(70)。これらのクローンの特徴は、制限酵素及びサザンプロット分析によって明らかにされ、全 T_H コード領域が含まれていることが判明した。ジデオキシ停止法を用いて、ゲノムクローンの特異的フラグメントを配列決定することによって、 T_H 遺伝子の完全なイントロン⁵エクソン構造が決定された(35, 36)。

第8及び10図に示したように、 T_H 遺伝子は、8つのイントロンによって分割された9このエクソンから成る。第1のエクソンは5'非翻訳領域及びリーダーセグメントを含む。第1番目のV様領域 V_1 は残基289に位置する大きなイントロンによって分断されている(第6図)。従って、 V_1J_1 領域は、第2及び第3番目のエクソンにコードされており、 V_2J_2 、 V_3J_3 、 V_4J_4 及び膜通過(TM)領域は、それぞれ別のエクソンにコードされている(エクソン4-7)。細胞質領域

(C Y T) は、イントロンによって分断され、この領域の最後の部分は3' 非翻訳領域とともに第9番目のエクソンにコードされている。

T_4^+ 及び T_8^+ 形質転換細胞の構築

AIDS ウイルス感染における T_4 の役割に関する研究において、最初に用いられた実験手法は、ウイルス感染を助けることのできない T_4^- 細胞系内に T_4 遺伝子を導入することから成る。こうして得られた形質転換細胞は AIDS ウイルスに対する感受性について試験し、次いで、 T_4 がウイルス感染を媒介するメカニズムについて研究した。

T_4 の表面抗原をコードする全長 cDNA クローンをレトロウイルス発現ベクター、pMV7 にサブクローン化した。発現ベクター pMV7 (第11A 図) は、単一 EcoRI クローニング部位を端に有する二つの直接に反復される、モロニーネズミサルコーマウイルスの LTR (long terminal repeat) を含有している。5' -LTR はクローニング部位をつうじて構成的 (constitutively) に転写を促進し、一方、3' -LTR は RNA の切断及びポリアデニル化に必要な配列である。更に、pMV7 には、細菌ネオマイシンホストトランスフェラーゼ遺

伝子 (neo) のコード領域に融合したヘルペスウィルスチミジンキナーゼプロモーター (tk)、ドミナント選択マーカーが含まれており、共形質転換及び感染をリンクさせておこなうことを可能にしている。

T_4^- pMV7 は、夫々、欠損自己指向性及び両指向性 (anphotropic) プロウィルスを含む (44. 49)、 ϕ -2 及び ϕ -A M 細胞、及び N I H 3 T 3 細胞系に導入された。第11B 図参照。両細胞系は、内因性ウィルス RNA のキャプシド化 (encapsidating) を起こさせることは出来なかったが、真正の全てのトランスウィルス機能を提供し得た。 T_4^- pMV7 によるこれら細胞系の安定した形質導入 (トランスフェクション) によって、ヘルパーウィルスフリーの T_4 をコードする組換えレトロウィルスストックの生産が生じられた。これら純粋なウィルスストックは、次いで、マウス及びヒト細胞に、レトロウィルスの標的細胞による生産なしに、 T_4 配列を効率的に導入するために使用された。

簡単に述べると、DNA-媒介遺伝子移入操作を用いて T_4^- pMV7 DNA を ϕ -2 細胞内に導入した (第11B 図、25, 27)。ネオマイシンアナログ G 418 (Geneticin) を含む培地中

で増殖し得る能力を有する Neo⁺ 陽性コロニーを選択し、in situ ロゼット形成アッセイを用いて細胞表面上の T_4 発現についてスクリーニングを行った (20, 70)。 T_4 を発現している形質転換 ϕ -2 細胞は、 10^5 cfu/ml の力価で組換えレトロウィルスを産生するものとして同定した。この T_4^+ - ϕ -2 クローンは次にマウス ϕ -A M 細胞感染することのできるレトロウィルスを生み出す為に使用された。組換えレトロウィルスを 10^4 cfu/ml の力価で産生する T_4 発現 ϕ -A M クローンを単離した。 T_4^+ ヒト形質転換体は、マイトマイシン C 処理又は ϕ -A M クローンとの共培養 (co-cultivation) によって得られた (第11B 図)。 T_4^+ 形質転換体は次いでノーザンブロット分析にかけ、フローサイトメトリーによって T_4 が発現されて細胞表面に存在していることが確認された。 T_8 表面タンパクを発現するコントロール細胞系も同様の方法で作製した。

T_4 は AIDS ウイルス感染に必須である。

ヒトリンパ球表面に T_4 タンパクが十分に存在し該細胞を AIDS ウイルス感染に対して感受性にし得るか否かについてまず決定するために、プリミティブな T 細胞白血病細胞系、H S B 2 の形質転換体、即ち、初期 T リンパ球タンパク T_1 及

び T_{11} のみを表面に発現するものを構築した。H S B 2 は T_4 又は T_8 のいずれも発現せず、T 細胞抗原レセプター又は関連 T_3 タンパク複合体のいずれをも発現しない。 T_4 又は T_8 タンパクを発現する H S B 2 の形質転換体を選択し、AIDS ウイルスに対する感受性について決定した。AIDS ウイルス感染を評価するために、幾つかの異なる実験手法が採用された。例えば、逆転写酵素の発現 (52)、イムノフルオレッセンスマイクロスコピーによる細胞質内におけるウィルス発現 (46)、イムノアッセイによる培養上清中のウィルス抗原の検出 (47)、フィトヘマグルチニン (P H A) -刺激素精リンパ球を用いたスーパーナート (supernate) サブカルチャーによる感染ビリオンの産生 (46) などが挙げられる。これらのアッセイを用いて、H S B 2 細胞系の AIDS ウイルス感染の証拠は得られなかった (表 I)。

表 1

AIDSウイルス感染に対する T_4^+ 及び T_8^+ ヒト形質転換体の感受性

ヒト細胞	最大逆転写酵素	細胞質ウイルス	浮遊物 (Supernate) ウイルスAg	浮遊物副培養	シンチウム 誘導	VSV(AIDS) シュードタイプ 感染	ウイルス 結合
CEM(T_4^+)	675023	+	+	+	+	+	+
HSB2	4245	-	-	-	-	-	-
HSB2- T_8^+	4460	-	-	-	-	-	-
HSB2- T_4^+	190915	+	+	+	+	+	+
Raji	ND	ND	ND	ND	-	-	ND
Raji- T_8^+	5595	-	-	-	-	-	-
Raji- T_4^+	103500	+	+	+	+	+	+
HeLa	6438	-	-	-	-	-	-
HeLa- T_8^+	4875	-	-	-	-	ND	-
HeLa- T_4^+	48125	+	+	+	+	+	+

5×10⁶細胞にAIDSウイルスを接種し、37℃で24時間インキュベートし、洗浄して新鮮培地に再プレート化した。
細胞及び浮遊物を3, 6, 9, 12, 18, 20, 24及び28日に取り出し、4種のウイルス検出アッセイに使用した。即ち、逆
転写酵素、細胞質ウイルス、浮遊物ウイルス抗原及び浮遊物副培養である。FU
シュードタイプ感染実験の結果は次のように表す。+(210³ PFU/ml); -(10PFU/ml); ND, 測定せず

さらに、AIDSウイルスに対するレセプターを有する非感染ヒト細胞をAIDSウイルス産生細胞と共に培養すると広範囲な細胞融合が起こることが以前に示されている(54)。このアッセイにおいては、HTLV-I及びHTLV-II産生細胞により多量のシンチウムが生成されているにもかかわらず(データは示していない)、HSB2細胞をAIDSウイルス産生H9細胞と混合した場合シンチウムの誘導は起らない(表I)。

最後に、AIDSウイルスのエンベロープ糖タンパクを有する小胞状口内炎ウイルス(VSV)のシュードタイプ(pseudotype)を使用して、ウイルスの侵入(entry)を試験した(表I)(53,54)。AIDSウイルスに感染した細胞をVSVにより重感染すると、高度免疫抗VSV血清による中和に抵抗するのに充分なAIDSウイルスエンベロープ糖タンパクが一部の子孫(progeny)VSVにより得られた。これ等のVSV(AIDS)シュードタイプビリオンの宿主範囲は、AIDSウイルスに特異的なレセプターを発現する細胞に制限される。細胞の侵入及びビリオンの脱被覆の後、トランスカプシド化されたVSVゲノムが複製し、非シュードタイプ粒子が生成する。二次感染の間に、感染細胞から放出された子孫

VSVが近くのVSV(AIDS)シュードタイプ感染に抵抗性を示す指示細胞(ミンクCCLS4またはウシMDBK細胞)に侵入し、破壊する。その結果得られるVSVブラークの形成をカウントする。このようにVSV(AIDS)シュードタイプの感染により、ウイルスの侵入の定量的細胞病理(cytopathic)ブラークアッセイが得られる(54)。このアッセイにおいては、HSB2細胞をVSV(AIDS)シュードタイプにさらした場合、バックグラウンドに対するブラークは観察されなかった(表I)。HTLV-Iエンベロープ中にカプシド化されたVSV RNAのシュードタイプ(VSV(HTLV-I))による対照実験では多数のブラークが観察され、これはHTLV-Iレセプターを有するHSB2細胞がVSVを効率的に複製できることを示している。これ等の観察は、AIDSウイルスエンベロープ中にカプシド化されたVSVゲノムはHSB2細胞中に侵入できないことを示している。

機能性(functional) T_4 cDNAのHSB2への導入がこの細胞をAIDSウイルス感染に対して感受性にするかどうかについて調べた(表I)。HSB2- T_4^+ 形質転換体を

AIDSウィルスにさらすと、逆転写酵素活性の発現により(52)、免疫蛍光顕微鏡観察による細胞の細胞質中のウィルスの発現により(46)、イムノアッセイを使用しての培養浮遊物中のウィルス抗原検出により(47)、そしてPHA刺激リンパ球との浮遊物(supernate)副培養による感染性ウィルスの産生により(表I)(46)測定される、有為なウィルス感染が生起する。対照HSB2-T₈⁺細胞はそれぞれのアッセイにおいて一貫して陰性であった。

さらに、異なるT₄⁺T細胞がAIDSウィルスに感染される効率も測定した。HSB2-T₄⁺及びHSB2-T₈⁺形質転換体、天然に単離されたT₄⁺T細胞系CEM、並びにPHA刺激末梢リンパ球を、連続的に10倍希釈したAIDSウィルスにさらし、洗浄し、プレート化して微量培養した。ウィルスに受容する曝露後12日に、イムノアッセイを使用して感染培養の頻度を測定した(第12図)(47)。このようにして、さらした培養の50%を感染させるのに必要なAIDSウィルスの力価(ID-50)を決定した。PHA刺激末梢リンパ球のID-50は、天然に単離されたものあるいは形質転換T₄⁺細胞系について見られたものの2-3乗倍の大きさである。HSB2-

T₄⁺細胞の感染効率は、天然に単離されたT₄⁺T細胞系CEMについて見られたものより約10倍高い(第12図)。対照HSB2-T₈⁺細胞は、調べた最高のウィルス力価においても感染に対して非感受性である。

シンシチウム形成及びVSV(AIDS)シュードタイプの複製の両方を維持するHSB2-T₄⁺細胞の能力も調べた。HSB2-T₄⁺細胞をAIDSウィルス産生H9細胞と共に培養すると、18時間以内にシンシチウム形成が容易に観察される(表I及び表II)。さらに、シンシチウム誘導は培地を抗T₄Aモノクローナル抗体で前処理することにより消滅する(表II)。そしてHSB2-T₄⁺細胞をVSV(AIDS)シュードタイプにさらすと、感染性VSV粒子が生成され、近くの指示細胞を破壊する(表I及び表III)。さらにブラック形成は、抗AIDSウィルス抗体または抗T₄Aモノクローナル抗体による前処理により阻害される(表III)。対照HSB2-T₈⁺細胞は、AIDSウィルス感染の検出に用いた7つのアッセイのそれぞれにおいて、一貫して陰性であった(表I、II及び表III)。これ等の観察は、ヒト未成熟Tリンパ球においては、T₄タンパクが単に存在することがAIDSウィルス感染に必

要な本質的機能をもたらすという遺伝学的証拠を与えるものである。

表 II

T₄⁺ヒト形質転換体におけるシンシチウム誘導

シンシチウム誘導

ヒト細胞	H9/AIDS	H9/AIDS + αCT ₄ A
JH(T ₄ ⁺)	++++	-
8166(T ₄ ⁺)	++++	-
HSB2	-	ND
HSB2-T ₈ ⁺	-	ND
HSB2-T ₄ ⁺	++	-
Raji	-	ND
Raji-T ₈ ⁺	-	ND
Raji-T ₄ ⁺	+++	-
HeLa	-	ND
HeLa-T ₈ ⁺	-	ND
HeLa-T ₄ ⁺	++++	-

2×10⁵細胞を2×10⁴のAIDSウィルス産生H9細胞

(H9/AIDS)と共に培養し、37℃でインキュベートした。18時間後にシンシチウム形成について培養を調べた。結果はシンシチウムに含まれる核の概算パーセンテージで示す。-(シンシチウムなし); ++ (25%); +++ (50%); +++++ (90%); ND (測定せず)。シンシチウム阻害は、抗T₄Aモノクローナル抗体(αT₄A; 1:20)を接種時に混合培地に加えて測定した。天然に単離されたT₄⁺T細胞系JM及び8166をこれ等の研究の陽性コントロールとして使用した。

表 四

ヒト細胞	VSV (HTLV-I) + α HTLV-I		VSV (AIDS) + α AIDS		+ α T ₄ A
	PFU/ml	PFU/ml	PFU/ml	PFU/ml	
CEM(T ₄ ⁺)	20,000	50	42,000	50	200
HSB2-T ₄ ⁺	10,000	50	0	ND	ND
HSB2-T ₄ ⁺	12,000	50	1,000	100	300
Raji-T ₄ ⁺	5,000	ND	0	ND	ND
Raji-T ₄ ⁺	5,000	50	1,500	25	150
Hela	10,000	ND	0	ND	ND
Hela-T ₄ ⁺	10,000	50	17,000	50	200

2 × 10⁵ 細胞をVSV (AIDS) シュードタイプ(53,54) と共に1時間37℃でインキュベートした。次に細胞を洗浄し、1 × 10⁶ ミンク CCL 84 またはウシ MDBK ブラック指示細胞を各ウェルに加えた。これ等はVSV感染を許容するが、VSV (AIDS) に対して抵抗性である。培地を寒天培地で覆い、感染後2日にVSVブラックをカウントした。抗T₄ Aモノクローナル抗体 (α T₄ A : 1 : 20) または抗AIDSウィルス血清 (α AIDS : 1 : 10) を使用してシュードタイプ(54)にさらす30分前に細胞を前処理することによりVSV (AIDS) シュードタイプブラック形成を阻止した。広範囲な種類のヒト細胞型(54)上にプレートするVSV (HTLV-I) シュードタイプをこれ等の実験の対照として用いた。VSV (HTLV-I) シュードタイプブラック形成を阻止するのに抗-HTLV-I血清(1 : 10)を用いた。結果はPFU/ml及びND(測定せず)で表す。

(以下余白)

AIDSウィルスの感染はTリンパ球へのみに制限されない

機能性T₄ cDNAを2種のヒト非T細胞系に導入した。即ち、子宮癌に由来する上皮細胞系であるHela(72)及びバークITTリンパ腫の患者に由来するBリンパ芽球様細胞系であるRaji(73)である(第118図)。レトロウィルス媒介の遺伝子転移の前は、これ等の細胞系は表面T₄タンパクあるいはT₄ mRNAを発現せず、AIDSウィルス感染に対し感受性ではない(表I)。さらに親細胞系はシンシチウムの誘導及びVSV (AIDS) シュードタイプのプレーティングを維持しない(表I、II及びIII)。

これに対し、T₄⁺ Raji及びHela形質転換体は、前記した全ての基準によりAIDSウィルス感染を保持した(表I)。

Raji T₄⁺細胞がAIDSウィルスに感染され得る効率は、HSB2-T₄⁺細胞の場合とはほぼ同様であり、天然に単離されたT₄⁺ T細胞CEMの感染の効率の約10倍高いものである(第12図)。さらに、AIDSウィルス産生H9細胞との共培養においては、Raji-T₄⁺及びHela-T₄⁺細胞はシンシチウム誘導を保持し、これは抗T₄ Aモノクローナル抗体での前処理培養により消滅する(表I及びII、第13図)。さらに、こ

れ等の細胞をVSV (AIDS) シュードタイプにさらすと、感染性VSVが産生され、ブラックが形成されるが、これは抗AIDSウィルス抗体または抗T₄ Aモノクローナル抗体での前処理による阻止される(表I及びIII)。対照Raji-T₈⁺及びHela-T₈⁺形質転換体はこれ等の測定のそれぞれにおいて一貫して陰性である(表I、II及びIII)。

従って、機能性T₄遺伝子のヒトTリンパ球、Bリンパ球あるいは上皮細胞への導入は、これ等の細胞をAIDSウィルス感染に感受性にするに充分なものである。まとめると、これ等の観察はin vivoで観察されるT₄⁺ T細胞の指向性はT₄分子の制限された発現の結果であり、それが発現された細胞型の性質ではないことを示している。

(以下余白)

AIDSウィルスは表面 T_4 蛋白質に結合する

前記の実験は T_4 発現がAIDSウィルス感染に必要とされる遺伝的証拠を提供するが、ウィルス生活環におけるこの分子の役割に関する知見は与えない。 T_4 の表面発現がAIDSウィルス感染に必要であるという観念は、 T_4 がAIDSウィルス受容体であることを示唆している。従って T_4^+ 及び T_8^+ 形質転換ヒト細胞の表面に対するAIDSウィルスの結合を吟味するにはクルオロサイトメトリーが使用された(表1; 第14図)。HSB 2, Raji, 及びHeLa細胞、並びに T_4^+ 又は T_8^+ 形質転換体をAIDSウィルスと共に定温培養した。ウィルス吸収に次いで、細胞を洗浄し、フルオレセイン共役した抗AIDSウィルス抗体に曝露して、フローサイトメトリーにより解析した。この試験によりAIDSウィルスは表面 T_4 を発現するヒト形質転換体には有効で特異的に結合するが、 T_4^- 親細胞にも T_8^+ 形質転換体にも結合しないことを示した(第14図B欄, 表1)。AIDSウィルスの T_4^+ 細胞に対する結合は抗 T_4 モノクローナル抗体と予備培養することにより制されるが、抗 T_8 モノクローナル抗体との予備培養では止められない(第14図, C欄)。更に、 T_4^+ 形質転換細胞

をAIDSウィルスに曝露するばあい、 T_4 糖蛋白質はウィルス外膜(envelope)糖蛋白質と共同沈降するのであって、これはこれらの分子間の直接の物理的結合を示唆している(データは示さない)。これらの結果はAIDSウィルスが細胞表面上の T_4 分子に結合することと、この結合は試験した T_4^+ 細胞のすべての型に生起するのでT細胞特異性の他の蛋白質には無関係であることを示している。

以前の研究では包み込まれたウィルスについて2つの別個の進入経路が記載されている(74,75,76,77) 若干のウィルスは原形質膜と直接融合するものがあり、そのヌクレオカプシドを細胞質中に放出するのであって、その際ウィルスの他のものは受容体仲介のエンドサイトシスにより取り込まれてしまう。その際、エンドソームの酸性環境は液胞の境界膜とのウィルス外膜の融合を容易にする。細胞封入体経路を経由して細胞に入るウィルスによる感染は、エンドソームから脱酸する弱塩基のような薬剤を用いて細胞を処理することによって抑制することができる(58,78,79,80)。塩化アンモニウム存在で、エンドソーム中では融合が遮断されるがリソソーム低下はなおも低下した速さで進行する(80)。

かような訳で T_4^+ T細胞系JMのAIDSウィルス感染に対する塩化アンモニウムの影響を試験した。塩化アンモニウムのないばあいは、AIDSウィルスに曝露したJM細胞の50%以上が、感染後5日でウィルス抗体を発現することは免疫蛍光法鏡検により測定された通りである。ウィルスの添加時又はウィルス添加後30分以内かのいずれかで、JM細胞を塩化アンモニウムに(6時間)曝露するばあい、ウィルス感染の95%より大きな阻害が認められた。しかし、ウィルス添加後1時間で細胞を塩化アンモニウムで処理したばあいは、感染の阻害は認められず、受容体仲介のエンドサイトシスを経て細胞に入る他のウィルスに対し記載したウィルス侵入の速度論と一致する発見であった。結局、塩化アンモニウム効果は完全に可逆的であった。塩化アンモニウムに1時間曝露した後、洗浄により同化合物を無くしてAIDSウィルスに曝露した細胞は、ウィルス性感染の制御水準を支持した。これらの結果は、塩化アンモニウムの除去の際、エンドソームのpHが1~2分以内で当初の低い値に戻るという以前の観察と矛盾しない(78,80)。エンドソームを脱酸する化合物であるアマンタジンをを用いて同様な結果が得られた。

これらの結果は、 T_4 -AIDSウィルス複合体のエンドサイトーシス及びエンドソーム境界膜とのウィルス外膜の、低pH誘発融合してかわり、細胞の細胞質中にウィルス性ヌクレオカプシドを放出するウィルス侵入の機序と整合する。

T_4 メッセンジャーリボ核酸は脳で発現される

細胞性免疫システムの破壊に加えて、AIDSがしばしば伴うのは、中枢神経系(CNS)障害であって、それはAIDSウィルスによる脳細胞の直接感染の結果と考えられる(81)。従って T_4 がCNS内の細胞に発現し、これによりウィルスの向神経性の説明を提供するかどうかを決定することに関心があった。 T_4 mRNA配列がCNSに発現するかどうかを決定するためヒトとマウスの両方の脳から調整したRNAのノーザン・ブロット解析を実施した(第15図)。ヒト大脳皮質由来のポリ(A)⁺RNAはほぼ3及び1.8kbの分子量を持つ2つの別個の T_4 mRNAを含む(第15A図)。より弱い3kbRNAは2つの T_4^+ 白血病細胞系、即ちU937(単球細胞系)及びJurkat(T細胞系)、並びに末梢性Tリンパ球によって発現するメッセンジャーリボ核酸(mRNA)と大きさが同じである。小さい方のより豊富な1.8kb mRNAはTリンパ球を欠き、別

法のスプライシング又は代替の5'又は3'末端から生成することができた。

T_4 mRNAの局在の更に慎重な解析はマウス脳の特長領域からポリ(A)⁺ RNAを単離することにより実施した(第15B図)。 T_4 のネズミ相同染色体である $L_3 T_4$ を記号化する放射性標識cDNAによるハイブリッド形成は、後脳試料には存在しないマウス前脳中の強度の2.2kb mRNAを明らかにした。2.2kb $L_3 T_4$ mRNAは皮質、視床下部に検出が可能で、線状体にもっとも豊富にあるが、小脳、脳幹、又は脊髄には存在しない(データは示さない)。CNS中に検出される2.2kb mRNAは胸腺細胞中の $L_3 T_4$ を記号化する3.2kb mRNAよりも小さく、約1kbである(第15B図)。これらの結果は、AIDSウィルスが発揮する向神経性が脳細胞に及ぼす T_4 分子の表面発現の結果と思われる。前脳で検出されるmRNAの水準は胸腺細胞中の水準の約1/30である。このことは大多数の細胞による低水準の発現又は小さい部分集団の細胞による比較的高水準の発現を反映するともいえる。 T_4 が神経細胞又は支持細胞により発現されるかどうかは現在知られていない。しかしながらCNS中の異形転写体(variant

transcript)の存在は、脳の T_4 mRNAが稀少な侵入Tリンパ球により発現することを確からしくしている。

討論

T細胞の機能的に別個なサブセットを用いる T_4 及び T_8 の分離はこれらの分子が適当な標的細胞とTリンパ球の相互作用において重要になり得ることを示唆している。これらの蛋白質の特異的役割を理解する第一歩として、cDNAクローニングが T_4 及び T_8 の両分子について得られ、それらの核酸塩基配列が決定された(20, 70)。 T_4 及び T_8 の演繹した蛋白質配列の比較は、これらの分子が免疫グロブリン可変(V)ドメインを持ち、且つ免疫グロブリン超遺伝子系統群(superfamily)の構成員としての有意性配列と構造上の相同性を共有することを示している。しかしながら、 T_4 及び T_8 のN-末端V様領域は全く異なっている。すなわち、それらの分子は28%の相同性を共有しているに過ぎず、従って各分子の免疫グロブリン軽鎖に対する相同性よりも分子相互の相同性の方が低い(第9A図)。更に、 T_4 と T_8 との間の最大維持(conservation)領域はまた免疫グロブリンに対する最も強力な相同領域及びT細胞リセプターV領域でもある。従ってこれらの二つの分子の免

疫グロブリン様領域は、構造的に類似しているけれども、それらが標的細胞の異なるサブセット上の異なる分子を認識するという仮説と矛盾しない意味のある配列相違(divergence)を示している。

T_4 及び T_8 のN-末端領域によって共有されるV様領域の構造的相同部分は、これらの蛋白質の機能に特に関連したものであるかも知れない。免疫グロブリン超遺伝子系統群の実質的にすべての種類は、免疫応答に関係している(62)。更に、この系統群の個々の種類は互いに強力に会合して二量体を形成する傾向を示す。この会合は免疫グロブリンの重鎖と軽鎖、T細胞抗原リセプターの α 鎖と β 鎖、 β_2 -ミクログロブリンとクラスII MHC蛋白質、並びにクラスII MHC分子の α 鎖と β 鎖の相互作用において明白である。 T_8 糖蛋白質は、推定されたMHC様分子である T_8 と胸腺細胞表面上でジスルフィド結合を形成し、また末梢Tリンパ球上の32kdサブユニットの多重体として存在している(83)。 T_4 中の4つのV様領域の存在は、これらの領域が相互に、及び他の細胞又はウィルスの表面上の特異的リガンドと会合することを示している。免疫グロブリン様分子のこれらの特異的親和性は、 T_4 及び T_8 の認識機能

にとって重要であるのかも知れない。

T_4 の進化

免疫グロブリン及びT細胞抗原リセプター遺伝子において、V及びJエクソンは広く分離され、体細胞の組換えイベント(somatic recombination event)の後にのみ、並置されるようになっている(62, 63)。 T_4 mRNAは、DNA組換えイベントを必要とすることなく、連続的(contiguous) V-及びJ-様エレメントを4つコードする。従って、 T_4 は再配列(rearrangement)メカニズムの発生以前に生じたより原始的な遺伝子を反映している可能性がある。このことはさらに、最初の T_4 のV様領域(V1)が、免疫グロブリンもしくはT細胞抗原リセプターのいずれかをコードするV遺伝子中に存在しないイントロンによって分割されているという最近の知見によって支持される。イントロンが進化過程で注意深く除かれること及び、イントロンが以前にはイントロンのない環境中に挿入されることは極めてありうることであり、度重なる証拠から示唆されている。このように、 T_4 は先祖の免疫グロブリン遺伝子を表わしていると思われ、この遺伝子が複製、分岐、及び再配列(転位)して現在の免疫グロブリン遺伝子フ

ファミリーを形成したと考えられる。現在の極めて複雑な免疫系においても機能しているが、 T_4 はより原始的な細胞系免疫応答において機能するレセプターを反映しているであろう。無脊椎動物のもののように、原始的な免疫応答は、レセプター分子の逸脱レパートイヤー (diverse repertoire) を含まないと考えられるが、最も単純な場合には、自己及び非自己の間の区別に限定され(85,86)、さらに再配列を起こさない「静的な」遺伝子群によって説明されると思われる。

進化時に T_4 の出現の順序がどのようであれ、この遺伝子の構成はエクソン混合 (shuffling) の興味深い例を示している。 T_4 は4つのV-J-様領域から成っており、J-様領域及び膜間セグメント (transmembrane segment) は、スーパー遺伝子ファミリーの異なるメンバーでの相同性を各々分け合っている。V-及びJ-様領域は、免疫グロブリンとT細胞抗原レセプターの両方の相応する領域と相同である。膜間領域は、クラス II MHC分子の β -鎖におけるこの領域とかなりの相同性を示す(第90図)。従って、 T_4 は免疫グロブリンのスーパー遺伝子ファミリーのいくつかのメンバーにおいて保存されたエクソンの集合から成っており、この遺伝子ファミリーは異なった

様式で混合されて、免疫応答に関与する種々の多くの分子を生成する。

T_4 はAIDSウィルスレセプターである

本明細書で提供したデータは、先ず細胞表面においてAIDSウィルスと T_4 分子との特異的会合を伴うAIDSウィルス感染のメカニズムを示す。この会合は、Tリンパ球、Bリンパ球及び上皮細胞において証明され得、従ってT細胞特異的タンパクの関与を必要としない。更に、本明細書に提供するデータは、 T_4 -AIDSウィルス複合体はレセプター仲介エンドサイトーシスによりインターザリネーションされ、次いでウィルスエンベローブはエンソームの制限膜と融合し、ヌクレオキャプシドを細胞質に放出することを示す。ウィルス複製及び転写は、リンパ系及び非リンパ系細胞株の両者で起こり得る。更に、 T_4 遺伝子は脳並びにリンパ球において発現し、AIDSウィルスの二重向神経性 (dual neurotropic) 及びリンフォトロピック (lyphotropic) 特性に対する一つの説明を提供する。このやり方において、特に T_4 細胞の集団に対するAIDSウィルスを標的とするため、エフェクター細胞-様細胞相互作用を仲介するのに重要なTリンパ球表面タンパクが、ヒトトロウ

ウィルスによって利用されてきた。

細胞表面レセプターは多数のエンベローブド・ウィルスについて同定されてきており、しばしば宿主の範囲及び特定ウィルスの指向 (tropic) 性はこれらのレセプターの発現のパターンのせいである(74,76)。あるウィルスはごく狭い範囲の細胞タイプに感染し、標的細胞の特定集団におけるウィルスレセプターの発現に影響する。例えば狂犬病ウィルスはニコチン性アセチルコリンレセプターと相互作用し、骨格筋とニューロンに大きく感染する(87)。ところがEB (Epstein-Barr) ウィルスはC3d補体レセプター・タイプ2と相互作用し(88)、Bリンパ球に感染する。ミクソウィルスのような他のウィルスは細胞表面上に偏在的に分布するシアル酸残基と相互作用し、より広範囲の細胞タイプに感染する。

細胞表面レセプターの制限された発現は、ウィルスの向性に対する唯一の説明を提供する。あるウィルスは、分化した細胞タイプの制限された1つのセットにおいてのみ複製する。従って、Moloney マウス白血病ウィルス (Mo-MuLV) はマウス新生児においてT細胞リンパ腫を誘導し、更に、きわめて関連するFriendヘルパーマウス白血病ウィルス (Fr-MuLV) は主として赤

白血病を誘導する(80,90,91)。この向性は、Tリンパ球のMo-MuLVゲノム及び赤血球先駆体のFr-MuLVゲノムの効率的な転写を促進するLTRsにおける相違の結果と思われる(92,93,94)。

本明細書に示したように、AIDSウィルスの一次向性決定因子は標的細胞の表面における T_4 タンパクの発現である。リンパ系細胞及び骨髄性細胞並びに脳細胞へのin vivo 感染は制限される：3つの集団は T_4 を表す。in vitro 実験は T_4 の T_4 -ヒトBリンパ球及び上皮細胞 (これらの細胞はAIDSウィルスにとっての天然の標的ではなく、AIDSウィルスによる生産性感染に感受性にする) への誘導を示す。

実施例1：可溶性 T_4 フラグメント

可溶性 T_4 糖タンパク質フラグメントを細胞標品から制限プロテアーゼ消化を使用して調製する。代わりに、トランスメンブラン・ドメイン (領域が中性及び疎水性残基を含む) を欠く T_4 フラグメントをコードするDNA発現ベクターを構築し、そのような T_4 フラグメントを作るのに使用してもよい。これらのフラグメントは水溶液で可溶であり、リーダー (シグナル) 配列を有する。哺乳類細胞で発現する場合、これらのフラグメントはラフ小胞体/ゴルジ複合体に輸送され、結局は細胞から

分泌される。

実施例2: AIDS患者の治療

患者の血液及び他の体液中に存在するウィルスに結合して、*In vivo*で T_4^+ 細胞の感染をブロックするため、実施例1に記載した可溶性 T_4 糖タンパク質フラグメントは、典型的には医薬的に許容可能なキャリアー中で、ヒト免疫不全症ウィルスに感染した患者に投与される。代わりに又は更に、ウィルスが血液から分離し得るように患者の血液は固定化 T_4 糖タンパク質又は可溶性 T_4 フラグメントのいずれかを含むカラムを介して循環される。そのような処置は免疫システムがウィルスに対してより効果的な免疫応答をすることを可能にする。即ち非感染 T_4^+ 細胞を増殖させる。

可溶性 T_4 フラグメントは治療的なもの、即ち使用するHIV感染の細胞外及び細胞-細胞拡散の阻害剤として使用する。本出願人は、可溶性 T_4 フラグメントが*in vitro*でHIVが T_4^+ 標的細胞に対して結合、感染するのを阻害することを示した(実施例4参照)。可溶性 T_4 フラグメントのHIVに感染したヒトへの投与は、ウィルス感染の細胞外拡散を阻害する。更に、HIV-感染 T_4^+ 細胞及び非感染 T_4^+

トランスメンブレンセグメントの前で終結し、ヌクレオチド位置約1284で開始する(第6図)。この組み換えDNA分子はトランスメンブレンと細胞質ドメイン両者を欠く。EcoRI-HpaIIフラグメント(ヌクレオチド1~1252を包含する)をp T_4 Bのより小さいフラグメントから構築することにより、単離する。代わりに、膜-スパンニング(spanning)のみを除去し、細胞質ドメインに融合した V_4J_4 ドメインを脱離する。1つのアプローチは、p T_4 B由来ヌクレオチド1252~1342からHpaII部位を補うフラグメントを除去することである。このような構築物は、ラフ小胞体/ゴルジ複合体に進出し、結果として細胞から分泌するのに必要な T_4 シグナル配列を維持するさらに、これらの構築物は T_4 タンパクの細胞外部分を維持し、ここでヒト免疫不全症ウィルスエンベロープ糖タンパク質が存在する。

哺乳類系で可溶性 T_4 フラグメントを発現するために、修飾した T_4 cDNAフラグメントを、強い真核生物プロモーター/エンハンサー並びにRNAのポリアダニル化及び切断に必要なポリアダニル化部位を含むベクターにサブクローンする。例えば、シミアンウィルス(SV40)の初期プロモーター及びエ

細胞の融合(これはウィルスが拡散するルートである)は可溶性 T_4 フラグメントの投与により阻害される。

従って、可溶性 T_4 フラグメントの投与は病気の進行を遅らせ、AIDSに伴ういくつかの症状を軽減し、新しい病理学的変化の発生を防ぐ。

生化学的に純粋で水溶性試薬である可溶性 T_4 フラグメントは、 T_4 -HIV相互作用の競合体(competitors)を分析する他の試薬と組み合わせて使用する。HIVエンベロープタンパク又はHIVエンベロープタンパクを含有する生化学的混合物と組み合わせた可溶性 T_4 フラグメントを、ウィルス結合の阻害剤をスクリーニングするのに使用する。

実施例3: 可溶性 T_4 フラグメントの製造

膜結合した T_4 タンパク(p T_4 B)をコードするcDNAを単離し、特徴化し、哺乳類細胞タイプの変種で発現させた(70)。可溶性 T_4 フラグメントはバクテリア、酵母、昆虫及び哺乳類の系で産生する。恐らく T_4 タンパクは複雑に折り重なっているため、哺乳類の系における発現が好ましい。可溶性 T_4 フラグメントは V_4J_4 ドメインの後でp T_4 Bの端を切り取ることにより産生する。このようなDNAフラグメントは

エンハンサーは、可溶性 T_4 cDNAフラグメントから上流に位置する。SV40又は可溶性 T_4 cDNAフラグメントから下流のヒト成長ホルモン遺伝子のいずれかのポリアダニル化部位を配置することにより、転写終結及びRNAポリアダニル化が達成する。当業者に公知の任意の方法により選択マーカーと一緒にこれらのエレメントを含有する構築物の真核生物への導入は、外因性DNAの安定な組み込みを導く。選択培地におけるその成長能力により選択される形質転換体は、培養上清液へ可溶性 T_4 フラグメントを分泌する。可溶性 T_4 フラグメントはいくつかのアッセイの内の1つ(例えば、ラジオイムノ沈降法)により上清液中で検出し、精製する。可溶性 T_4 フラグメントの精製及び特徴化は細胞株を構築することにより著しく増強され、これは分泌したタンパクフラグメントを発現過多にする。タンパクの発現過多にさせる方法が、バクテリア、酵母、昆虫及び哺乳類の系で使用された。もし構造的に発現したなら有毒であるタンパクを生産過多にするため、誘導可能な発現系もバクテリアと酵母において使用された。可溶性 T_4 フラグメントの発現過多は可溶性 T_4 発現ベクターを増幅することにより完成され、構造的発現過多になる。薬剤メトトレキセート(dhfr

の拮抗剤)の連続的に増す濃度の成長によりジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)遺伝子の増幅が広く用いられた。配列をコードするdhfrに対し増幅されたユニットは制限されないで、このアプローチはそれらに隣接する配列の同時増幅(coamplification)する結果になった。従って、dhfrを選択的マーカーとして、及び新たに導入した配列を同時増幅する手段として使用する。この方法は、dhfrプラスミドでコトランスフォーメーションされた種々の遺伝子の発現を増加するのに首尾よく使用した。別の増幅スキームはプラスミドp d L A T-3と可溶性T₄ cDNA発現ベクターのコトランスフェクション、次いで既に記載した選択を伴う(102)。

従って、可溶性T₄ cDNA発現構築物は、dhfr発現プラスミドとコトランスフェクションされる。代わりに、可溶性T₄ cDNAフラグメントと同じプラスミド上にhfr遺伝子が存在し、リンクしたコトランスフォーメーションを許す。これらの構築物のdhfr欠失(dhfr⁻)チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞へのトランスフェクション及び続くメトトレキセートにおける選択は、新たに導入した配列を発現する安定な形質転換体を分離させる。いくつかのクローンを

精製し、培養上清液を回収し、可溶性T₄フラグメントの存在を分析する。可溶性T₄フラグメントの最大レベルを産生するクローンはノーザンブロット及びサザンブロット分析により更に特徴化される。次いでこれらの細胞株は、徐々に濃度が増したメトトレキセートを含む選択培地で培養される。この選択的圧力は新たに導入したdhfr遺伝子及び隣接T₄配列を増幅した。メトトレキセート最大濃度に達した後、生き残った細胞をノーザンブロット及びサザンブロット分析して、増幅の程度を決定し、可溶性T₄フラグメントの存在について培養上清液を調べた。

培養上清液中の可溶性T₄フラグメントの特徴化のため、いくつかの形質転換体を(³⁵S)-メチオニンで代謝的にラベルする。細胞溶解物(lysates)及び上清液を次いで市販の抗-T₄抗体を使用するラジオイムノ沈降法及びウエスタンブロット分析で分析する。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を沈着物上で実施し、分泌され、端を切った形のT₄の予想相対分子量(M_r)を観察する。哺乳類系で合成されるので、このタンパクは適当にグリコシル化し、折り重なっており、即ちジスルフィドブリッジが形成する。培養上清液から可溶性T₄

フラグメントを精製するため、抗-T₄抗体を使用するイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーを実施する。カラムに結合したタンパクを高い塩濃度及び低pHで溶出する。M_r及び溶出したタンパクフラクションの純度を決定するため、溶出した物質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施する。アフィニティー精製した物質をより特徴化するため更に、ラジオイムノ沈降及びウエスタンブロット分析をも実施する。

可溶性T₄フラグメントを産生するために同様のアプローチをバクテリア、酵母、昆虫で行ってもよい。更に、本明細書で記載したより小さいサイズのフラグメント(例えばV₁J₁ドメインのみを含有するような)を産生してもよい。

(以下余白)

ベクターの構築

組換えDNA操作を使用して、ヒトT₄ cDNA配列の塩基対(bp)1-1257を、SV-40初期プロモーターとウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化領域に従属するTAA終止コードとの間に配置した。T₄ cDNAのこの配列はT₄リセプターのリーダー及び予言された細胞外ドメインをコードしている。このsT₄ミニ遺伝子をヒトH-ras又はマウスジヒドロ葉酸リダクターゼと結合して、夫々ベクターpST₄CHras及びpST₄DHFRを作製した。これらのベクターの構築を以下のように行った。

pST₄salの構築:

プラスミドpST₄salを、他の2つのプラスミドJRT₄及びpUCsT₄から構築した。これらのプラスミドの構築を以下に詳述する。

の プラスミドJRT₄を構築:

プラスミドJRT₄を作製するために、プラスミドDSP1(103)をXhoIで切断し、SV40ポリAの初期領域を欠失し、XhoI部位をDNAポリメラーゼのクレノー(Klenov)断片を用いて塞いだ(filled in)。ウシ成長ホルモンポリアデニル化

領域(113)をBglII及びKpnIで切断し、KpnI部位をT₄ DNAポリメラーゼで処理して平滑化した。この230bp断片をDSP1に結合してDSP1BGHを作製した。DSP1BGHをSmaI及びSalIで切断し(SV40初期プロモーター、galKコード領域及びBGHポリA領域から成る)galKカセット(cassette)を、SalI末端、BglII末端及びSmaI末端から成る合成リンカーを使用することにより、pUC19(107)中のSalI部位に結合した。この3つの部分結合の結果、プラスミドDSP1BZBGH、JTが得られた。

DSP1BZBGH、JTをStuI及びBclIで切断してgalKコード領域を欠失させたものを、プラスミドpT₄B(70)由来T₄cDNAを含む1.7kbのEcoRI(フィールドイン) - BamHI断片に結合して、プラスミドJRT₄を作製した。

プラスミドpUCsT₄の構築:

プラスミドpUCsT₄を作製するために、プラスミドpT₄B由来T₄cDNAのHaeIIおよびHpaII断片(1125bp)を、XpnI及びXbaIで切断されたベクターpUC18に合成リンカーを使用して結合した。T₄cDNAのHaeII末端を、KpnI末端及びHaeII末端をもつ合成リンカーを用いて

pUC18のKpnI部位に結合した。T₄cDNAのHpaII末端を、HpaII末端及びXbaI末端をもつ合成リンカーを用いてpUC18のXbaI部位に結合した。このリンカーもT₄コード領域のヌクレオチド1257の後のTAA停止コドンに挿入した。得られたプラスミドはpUCsT₄であった。

プラスミドpST₄salを作製するために、プラスミドJRT₄をBglII及びSacIで切断して(SV40初期プロモーターとT₄cDNAの最初の802個のヌクレオチドとから成る)、959bp断片を単離した。プラスミドpUCsT₄をSacI及びXbaIで切断して(合成リンカー由来TAAコドンに従属するヌクレオチド603-1257に由来するT₄cDNAから成る)、660bp断片を単離した。これらの2つの断片を、BglII及びXbaIで切断してSV40初期プロモーター及びフルレンジT₄コード領域を欠失させたDSP1BZBGH、JT中に結合した。

pST₄DHFRの構築:

プラスミドpST₄DHFRを作製するために、β-グロビンDHFR発現カセットを含むBglII - BamHIをpST₄salのBamHI部位に結合した。β-グロビン

DHFR発現カセットは、マウスβ-グロビンプロモーター(BglII部位を含有させるために合成リンカーを用いてプラスミドpPK288(108)の5'末端を修飾した。該プラスミド由来の550bp HindII断片)、マウスDHFRコード領域(プラスミドpSV2-DHFR(109)由来の735bp HindII(フィールドイン, fill-in))、DSP1(103)由来のNheI(フィールドイン) - BamHI(フィールドイン)SV40ポリA初期領域、及びマウスDHFR終止領域(BamHI部位を作製するために合成リンカーを用いてプラスミドmDH9(110)の3'末端を修飾した該プラスミド由来の907bp HindIII(フィールドイン)断片)から成る。pST₄DHFRのプラスミドマップは図示のとおりである。

pST₄cHrasの構築:

プラスミドpSVK(111)をEcoRV及びHindIII(フィールドイン)で切断してgalK領域を除去し、さらにプラスミドpSKcHras(112)由来の、cHrasに関するコード領域を含む870bp NdeI(フィールドイン) - (ヤエナリ(mung bean)ヌクレアーゼによって平滑化された)SalI断片中に結合することによってプラスミドpMERcHrasを作製した。

可溶性T₄転写カセットをBglII - BamHI断片を経てpST₄salから取り出し、pMERcHrasのBamHI部位(SV40初期ポリAに対して3')中に結合してpST₄cHrasを作製した。

哺乳類細胞中での可溶性T₄(sT₄)ミニ遺伝子の発現

N1H-3T3細胞中でのpST₄cHrasの発現:

10μgの担体DNA(N1H-3T3ゲノムDNA)の存在中、G418耐性を有するベクターであるプラスミドpTKnec 10μgを用いて、リン酸カルシウム沈澱法により、プラスミドpST₄cHras(10μg)をN1H-3T3細胞(前日、60mm培養皿当たり5×10⁵細胞を接種したもの)上に共沈澱させた。この細胞を沈澱DNAと一緒に37℃で6時間インキュベーションした。DNA沈澱物を取り出し、新鮮な培地(DMEM, 5% Nu-Serum^R (Collaborative REsearch, Inc., Lexington, Massachusetts))を該皿に加えた。16時間後、細胞をトリプシン処理し、3つの100mm皿中に接種し、次いで上記培地中に維持した。foci(約50/皿)が12-14日以内に現われた。形質転換されたfociのうち11個を選択し、広く引き伸ばした後、上記培地+500μg/ml GENETICIN^R G418 (Gibco Laboratories.

Grand Island, New York) 中に選択用の細胞 5×10^5 個/100mm 皿を接種した。11個のクローン全てが G 418 選択 ($500 \mu\text{g/ml}$) に生き残ったが、次に該クローンを標準タンパク質イムノブロット分析により H-ras (p Z 1) に関してスクリーニングした。

最も高いレベルの p Z 1 (約 $2 \text{ ng p Z 1} / \mu\text{g}$ -Triton可溶性タンパク質) を発現したクローンを、 ^{35}S -標識メチオニン及びシステインと一緒に18時間インキュベーションした。培養上清及び細胞溶解物を、 T_4 (OKT_4 , OKT_4A) 及び T_8 (OKT_8) リセプターに対して特異的なモノクローナル抗体、ras タンパク質に対して特異的なポリクローナル抗体、又は非特異的なマウス Ig G を用いて免疫沈降させた。s T_4 の予言されたサイズである約 45 kd のタンパク質を、 T_4 リセプターに対するモノクローナル抗体の両方を用いて培養培地から特異的に沈降させた。細胞溶解物中に、s T_4 バンドは観察されなかった。期待どおり、p Z 1 を該細胞から沈降させたが、培養上清からは沈降しなかった。これに続く定量は、精製 s T_4 と比較して、これらの細胞が、実施例 2 B に記載の CHO 細胞を使用した場合よりも約 100 倍低い比較的低レベルの s T_4 を

産生することを示している。

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 中での p ST_4 DHFR の発現:

DXB-11細胞、すなわち DHFR 分化 CHO 細胞系 (104) を、 $10 \mu\text{g}$ の担体 DNA (NIH-3H3ゲノム DNA) の存在中、 $10 \sim 30 \mu\text{g}$ の p ST_4 DHFR を用いてリン酸カルシウム沈降によりトランスフェクションし、1日後、60mm 皿に 5×10^5 細胞を接種した。この細胞を DNA 沈降物と一緒に 37°C で 6 時間インキュベーションし、培地を取り除き、次いで新鮮な培地 (F12, 10% FBS, 100 ユニット/ml ペニシリン及びストレプトマイシン) を該皿に添加した。16時間後、培地を再び交換し、細胞をさらに 24 時間インキュベーションした。次に、細胞をトリプシン処理し、3つの 100 mm 皿中に接種し、ヌクレオシド非含有培地 (ヒポキサンチン及びチミジンを含まない F-12, 10% 透析 FBS, 並びに 100 ユニット/ml ペニシリン及びストレプトマイシン) 中で選択した。7-10 日以内にコロニー (約 100/皿) が現われた。各皿からコロニーをプールし、広く引き伸ばした後、24穴培養プレート中に 5×10^3 細胞/ウェル及び 5×10^4 細胞/ウェルを、又は 5×10^5 細胞/100mm 皿を

接種した。20nM メトトレキサート (mtx) を含有するヌクレオシド非含有培地中で選択を開始する 3 日前に細胞を回収した。個々のウェル又はクローンを s T_4 発現に関して集散的にアッセイし、さらに増幅用に選択したクローンを上記の密度で 24 穴培養プレート中に接種した。接種後 3 日目に、ヌクレオシド非含有培地中の 800nM mtx での選択を開始した。この選択法を $8 \mu\text{M}$ mtx 及び $30 \mu\text{M}$ mtx での選択に繰り返し使用した。この方法を用いて、最小 3 pg/細胞/24時間 で可溶性 T_4 を発現する数個の細胞系を誘導した。

s T_4 の精製:

mtx 選択条件下、850 cdf ローラーボトル中に拡散させた付着性細胞培養物から、血清非含有のコンディショニング培地 (CM) を調製した。集散的に、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含まないリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) で細胞を 2 回洗浄し、生育培地 (ヒポキサンチン及びチミジンを含まない Ham's F12, 10% ウシ胎児血清, 100 ユニット/ml ペニシリン及びストレプトマイシン、並びに選択濃度の mtx) を、同様の培地から血清と mtx を取り除いた培地 + $1 \times 1 \text{ TS}$ (インシュリン, トランスフェリン及びセレン (Collaborative Research Inc.)) と置換した。

24-48 時間後、この培地を取り除き、選択生育培地と置換した。次いで、3-5 日以内に、血清非含有培地を置換し、さらにこのサイクルを 2 ヶ月以上の間、無期限に繰り返した。 $8,000 \times \text{g}$ での遠心分離によって CM を清澄させた。プロテアーゼ阻害剤 PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) を 0.5 mM となるように添加し、加圧膜濾過により CM を約 10 倍に濃縮した。この濃縮 CM を $2,000 \times \text{g}$ での遠心分離により清澄させ、プロテアーゼ阻害剤アプロチニン (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri) を終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した。このサンプルを直接又は -70°C での保存後に加工した。

濃縮した CM サンプルを 50 mM MES [2-(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸], pH 6.0 で 2 倍に希釈し、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを通して濾過した。次に、このサンプルを $100 \mu\text{M}$ pAPMSF (p-アミジノフェニルメチルスルホニルフルオリド) (CalBiochem-Behring, San Diego, California) で処理し、 50 mM MES, pH 6.0 で平衡化した S-Sepharose^R (スルホプロビル) (Pharmacia P-L Biochemicals, Piscataway, New Jersey) カラムに $1.5 \sim 2.0 \text{ mg/ml}$ ゲルのタンパク質濃度で適用した。 50 mM MES, pH 6.0 中、 $0 \sim 0.5 \text{ M}$ NaCl の

直線的濃度勾配を用いて、このサンプルを溶出させた。約 0.2 M NaCl で溶出したピークフラクションをブールし、pAPMSF 100 μ M で処理した。sT₄ を含むフラクションを SDS-PAGE 及びイムノブロットアッセイによって確認した。4℃に1時間放置した後、50mMビストリスプロパン [1,3-ビス[トリス-(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン]、pH6.0 に対して該サンプルを透析した。

このサンプルを100 μ M pAPMSF で処理した後、50mMビストリスプロパン (BTP)、pH9.0 で平衡化したQ-Sepharose^R (第四級アミノエチル) カラム (Pharmacia) (5 ml サンプル/ml-ゲル) に適用した。sT₄ サンプルはQ-Sepharose^R に結合せずに、非結合フラクション及びカラム洗浄液中に回収された。非結合サンプルをすぐにpH6.0 に調整した。

最終ステップとして、50mMリン酸塩、0.15M NaCl、pH7.0 で平衡化した30ミクロンSuparose^R 12カラム (2.5×46cm) (Pharmacia) 上でクロマトグラフィーを行った。カラムは3.0 ml/mlの流速で移動操作された。10mlずつ分画され、42分目のピークをバッチ操作により採取した。この方法によって、約3

OKT₄ Aは、T₄ レセプターの非干渉表面エпитープを認識する(114)。これらの抗体は、イムノブロット分析において還元SDS変性蛋白質に結合しないことから、ネイティブなコンホメーションで特異的である。次に記載するような免疫沈澱法を使うと、前記両方の抗体は³⁵S-ラベル培養上清からsT₄ を特異的に沈澱させることが明らかにされている。

60mm培養皿1つあたり1×10⁶ 個の細胞を含有するsT₄ -生産細胞の培養物を、1.5 mlのメチオニンとシステインを含まない1TS、170 μ Cl/mlの [³⁵S] メチオニンと30 μ Cl/mlの [³⁵S] システインを含むF12培地 (カリフォルニア州コスタメサ市のICN Biochemicals, Inc.) において、16時間37℃でラベルした。精製培地(100 μ l) を等容量の沈澱バッファー (10mMのリン酸ナトリウムpH7.5、100mMのNaCl、0.1%NP-40、0.5%の脂肪非含有乾燥ミルク) で稀釈し、15分間4℃で3 μ gのウサギIgGとともにインキュベートし、更に30分間4℃で30 μ l (充填容量) のプロテインAセファローズブルー (Pharmacia P-L Biochemicals) とともにインキュベートした。プレクリアーした上清を5 μ gのOKT₄ AおよびOKT₈ (ニュージャージー州 Raritan市の

pG/細胞/日を産生する細胞系に関し、全タンパク質20.0mg当たり約1.0 μ gの生成物が得られた。

sT₄ の特徴

物理的性質: 全蛋白質濃度は、カラーメトリックBCA蛋白分析法 (ビシンコニニック酸、イリノイ州ロックフォード市のPierce Chemical Co. 提供) を用いて決定した。絶対濃度は定量的アミノ酸分析法で決定した。精製sT₄ のアミノ酸組成は標準的なアミノ酸分析法により測定したが、実験誤差 (±15%) の範囲内で当該分子の予想したシーケンスと一致していることが判った。最初の20残基については、そのシーケンスは予想どおりであったが、ただlys-lys-val-val---で初まっていた。すなわち、成熟アミノ末端は予想したリーダークリップサイトに対して+3の位置から初まっており、当該位置で予想したシーケンスとはasnからlys変化で異なっていた。成熟アミノ末端の位置は、マウスおよびシープCD4蛋白質の決定しておいた末端とよく一致している。asnからlysへの変化は、シーケンシング上のエラー (単一の塩基変化) 又は組み換え操作中に生じた突然変異のためであると思われる。

イムノエпитープ: モノクローナル抗体OKT₄ 及び

Ortho Pharmaceuticals Corp. のP.Rao氏から提供を受けた)、マウスIgG (ペンシルバニア州 Malvern市のCooper Biomedical)、又はウサギの α -マウスIgG (Cooper Biomedical) と30分間4℃でインキュベートした。OKT₄ A、OKT₈、マウスIgGおよびウサギ α -マウスIgGは、20 μ l (充填容量) のプロテインAセファローズビーズとともに30分間4℃でインキュベートすることにより、沈澱させた。沈澱に続いて、ビーズを2回200 μ lの沈澱バッファーで洗浄し、その後NP-40と非脂肪乾燥ミルクを除いた200 μ lの沈澱バッファーで1回洗浄した。洗浄ビーズを20 μ lのサンプルバッファー (125mM Tris-HCl pH6.8、20%グリセロール、1.4 M β -メルカプトエタノール) 中で5分間沸騰し、12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲル上でその上清の電気泳動を分析した。同じような結果が、OKT₄ B、OKT₄ C、OKT₄ D、OKT₄ E、OKT₄ FおよびT₄ に特異的な他のMabsについても得られた。これらの結果から、sT₄ のコンホメーションは正確にT₄ レセプターの表面領域を模倣していることが判る。

sT₄ がHIV gp120 と協働し得るか否か及びこの協働が

HIVの T_4 細胞への結合を阻止し得るか否かを確かめるため、約5 μ gの精製 sT_4 を、OKT $_4$ もしくはコントロール抗体で被覆したセファローズビーズに吸着させた。次いでこのビーズを 35 S-メチオニラベルHIVの溶解物と混合した。

sT_4 とOKT $_4$ の結合体は120kdのエンベロープ糖蛋白質のみを共沈させる。 sT_4 が存在しないか又はトランスフェクションしていないCHO細胞からのコントロール上清が存在する場合には、OKT $_4$ ビーズで沈殿するウィルス性蛋白質は何もない。また、コントロールとしてのマウス免疫グロブリン(OKT $_4$ に調和させたアイソトープ)で被覆したセファローズビーズを sT_4 とともにインキュベートしても、ウィルス性蛋白質は沈殿しない。これらの研究は、Tリンパ球の表面に存在する他の細胞表面成分をもたない sT_4 がAIDSウィルスのエンベロープ糖蛋白質と特異的に共働し得ることを示している。

サイトフルオロメトリーを使って、完全なHIVのgp120と T_4 との相互作用によりAIDSウィルスの T_4 細胞表面への結合が阻止されることが判った。 T_4 CEM細胞を sT_4 が存在させるかさせないでHIVにさらした。ウィルス吸着の

後、細胞を洗浄し、フルオレセイン結合抗-HIV抗体にさらし、フローサイトメトリーで分析した(第17図)(48)。

sT_4 が存在しないと、HIVは T_4 CEM細胞に有効に結合する。HIVを sT_4 でブレインキュベートすると、ウィルスの T_4 細胞への結合は阻止される(第17図)。10ナノグラムの精製 sT_4 は、ウィルス性蛋白質100ナノグラムの結合を阻止するのに充分である。エンベロープ糖蛋白質が全ウィルス性蛋白質の5%を含むなら、 T_4 対gp120のモル比が計算値で5:1ならHIVの T_4 細胞への結合を完全に阻止し得る。

HIVによる T_4 細胞の感染を阻止し得る sT_4 の能力も調べた。フォトヘマグルチニン刺激ヒトリンパ球を sT_4 が存在させるか又は存在させないでHIV接種材料の逐次10倍希釈にさらし、洗浄し、そしてマイクロカルチャーに接種した。ウィルスにさらした後4日、8日および12日目にイムノアッセイを用いて感染培養の頻度を決定した(47)。このようにして、12日目の露出細胞培養の50%を感染するのに必要な希釈の逆数を感染性ウィルス力価ID $_{50}$ とした。 sT_4 が存在しないとき、ウィルス接種材料を用いて観察したID $_{50}$ は約 10^5 である。しかしながら、精製した可溶性 T_4 を8マイクログラム/ml存

在させると、感染性は略4 logsだけ $10^{1.5}$ のID $_{50}$ に減少する(第18図)。このHIVによる感染性の激減は、感染の全コースに亘って認められる。非特異的な阻止又は sT_4 の毒性影響に対するコントロールとして、ウィルスへの初期露出後18時間たって sT_4 を培養物に添加した。感染後18時間たって sT_4 に露出した培養物はID $_{50}$ において1 log 阻止しか示さない。このことはおそらく初期感染の後ウィルス拡散が阻止されたためであろう。このように、ウィルスを sT_4 とブレインキュベートした際にみられるウィルス感染性の4 log 減少は、ウィルス表面上での sT_4 とgp120との特異的な協働によるものであると思われる。したがってこれらの粒子はもはや細胞表面上の T_4 レセプターと相互作用することができない。1 mlあたり 10^5 個の感染性粒子を sT_4 の8マイクログラム/mlとブレインキュベートするときにも、4 logs 阻止が認められた。 10^5 個の感染性粒子/mlのウィルス調製物は、 10^9 粒子/mlを含有すると計算される。仮に各粒子が1000のエンベロープ糖蛋白質を含むなら、エンベロープ蛋白質1モル当り100個の T_4 分子の割合で阻止が認めらることになる。

構造的にインタクトな sT_4 が比較的大量に利用できるなら、

T_4 と抗原細胞の表面および T_4 とHIVウィルスの各相互作用のメカニズムに関する研究を前進させることができる。

T_4 ヘルパー細胞と抗原細胞(antigen-presenting cells)(B細胞およびマクロファージ)との相互作用の特異性は、少なくとも部分的には、 T_4 とクラスII MHC分子との協働によるものと思われる(105,106)。かなりの量の精製 sT_4 が利用できるなら、 T_4 とクラスII MHC分子との間の物理的な協働を直接調べることができる。

sT_4 がgp120と結合し得る能力および sT_4 がin vitroでウィルス感染を阻止し得る能力は、 sT_4 がAIDS患者の治療に有力な抗-ウィルス剤であることを示している。

実施例4: 可溶性V1V2 T_4 可溶性T-4フラグメントの生成ベクター構築

pST $_4$ BBV1 DHFRの構築: プラスミドpST $_4$ BBV1 DHFRをつくるため、プラスミドpST $_4$ DHFR(実施例3に記載)をEcoRIおよびXbaIで切断し、sT-4コード領域を含む小さいフラグメントを除去した。プラスミドsT $_4$ salをXbaIおよびBbvIで切断し、リーダー領域を除いた可溶性T-4シークエンスを含む1120塩基対のコードフラ

グメントを単離した。EcoR I エンド、Kpn I サイト、Bbv I エンドをもつ合成リンカーを使って、前記フラグメントを EcoR I / Xba I 切断 pST₄ DHFR に結合させた。このフラグメントは、上で単離した sT-4 フラグメントにある Bbv I と相補的である。得られたプラスミドを pST₄ BBV I DHFR という。

OMPAST₄ の構築: プラスミド OMPAST₄ をつくるため、プラスミド OMPA、GS を Nco I および Sa II で消化し、リンカー領域を含む小さいフラグメントを除去した。OMPAST₄ は、C II リボゾーム結合シーケンスの 3' 末端で Nde I サイトに挿入されている合成シーケンスをもつ PAST

(Rosenberg et al., Meth. Enzymol. 101: 123(1983); 米国特許第 4,578,355 号明細書) の誘導体である。合成シーケンスは、OMP A リーダーとそれに続くマルチニアーシーケンスを含む。合成シーケンスは実質的に次のものである。

5' -T ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG
GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGC TCT AGA GTC GAC
CTA GTT AAC TAG-3'

プラスミド pUCsT₄ を Nco I および Sa II で切断し、

する。sk727/725 の Ava I 末端を、pUCsT₄ (ヒト cDNA の 1198-1257bp を含み、T-4 レセプター続いて TAA 終結コドンのアミノ酸 351-369 をコードする) の Ava I - Xba I フラグメントに結合した。EcoR I および Xba I 末端でフランクしたこのシーケンスを、pUC19 ポリリンカー (sk727/725) の EcoR I および Xba I 末端で pUC19 に挿入した。sk727/725 は実質的に次のものである。

5' gaccagaaggaggagggtgcaatgctagtggttcggtgacgtgccaac 3'
gtcttctctctccacgttaacgatcaccaagcctaactgacgggtgagc 5'

pUCsT4106 の構築: プラスミド pUCsT4106 をつくるため、T-4 cDNA の EcoR I - Ava II フラグメント (1-413bp からなり、アミノ酸 (-) 25-87 をコードする) を Ava II サイトで合成リンカー-sk791/792 (Ava II - Ava I 末端) に結合した。sk791-792 は T-4 アミノ酸 88-104 をコードする。sk791/792 の Ava I 末端を pUCsT₄ (ヒト cDNA の 1198-1257bp からなり、T-4 レセプター続いて TAA 終結コドンのアミノ酸 351-369 をコードする) の Ava I - Xba I に結合させた。EcoR I および Xba I 末端でフランクしたこのシーケンスを、pUC19 ポリリンカーの EcoR I および Xba I 末端で

SCD-4 シーケンス [T-4 ヌクレオチド 124-1257] を含む 1149 塩基対フラグメントを単離した。このフラグメントを Nco I / Sa II 切断 OMPA、GS に結合させて OMPAST₄ を調製した。

OMPAST₄ Bbv I の構築: プラスミド OMPAST₄

Bbv I をつくるためプラスミド OMPAST₄ を Nae I および Xba I で切断した。この切断によって得られた sT-4 コード領域を含む小さいフラグメントを除去した。プラスミド ST₄ BBV I DHFR を Kpn I で切断し、得られた 3' オーバーハングを T₄ DNA ポリメラーゼで平滑末端とした。この平滑末端 DNA を次いで Xba I で切断し、CT₄ cDNA のヌクレオチド 145-1257 を含む 1124 塩基対フラグメントを単離した。単離フラグメントを Nae I / Xba I 切断 OMPAST₄ プラスミドに結合し、プラスミド OMPAST₄ Bbv I を調製した。

pucGT4184 の構築: プラスミド pucST4184 をつくるため、T-4 cDNA [アミノ酸 (-23) から (+178) をコードする 682bp フラグメント] から EcoR I - Nhe I フラグメントを Nhe I サイトで合成リンカー-sk727/725 (Nhe I と Ava I 末端) に結合させた。sk727/725 は T-4 アミノ酸 179-185 をコード

pUC19 に挿入した。sk791/792 は実質的に次のものである。

5' gaccagaaggaggagggtgcaatgctagtggttcggtgacgtgccaac
gtcttctctctccacgttaacgatcaccaagcctaactgacgggtgagc 5'

sT4184DHFR の構築: プラスミド sT4184DHFR をつくるため、pucST4184 (アミノ酸 355 ~ 373 に融合したアミノ酸 -25 ~ 183 をコードする) の EcoR I - Xba I フラグメントを、sT-4 をコードする EcoR I - Xba I フラグメントの代わりに、pST₄ DHFR の EcoR I および Xba I 末端に結合させた。

sT4106DHFR の構築: プラスミド sT4106DHFR をつくるため、pucST4106 (アミノ酸 351-369 に融合したアミノ酸 -23 から 106 をコードする) の EcoR I - Xba I フラグメントを、sT-4 をコードする EcoR I - Xba I フラグメントの代わりに、pST₄ DHFR の EcoR I および Xba I 末端に結合させた。

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における

pST4184DHFR の発現:

DHFR 欠損 CHO 細胞系 (Urtaub et al. 上記文献) である DXB-11 細胞に、60mm 皿に 5×10^5 個の細胞をシーディング

グしてから一日経過した後に、10 μ g のキャリアーDNA (N1H-3T3ゲノムDNA) を存在させて、リン酸カルシウム沈澱法により10~30 μ g のpST-4184 DHFRをトランスフェクションした。沈澱物を6時間後に取り出し、10%透析液¹⁰にウシ胎児血清を含むハイポキサンチン又はチミジンを含まないF12培地に置き換えた。コロニー(1つの皿あたり約100)が18日後に表われた。各皿のコロニーをブールし、拡張し、24ウェルの培養プレートに1ウェル当り 3×10^4 個の細胞をシードした。これらの細胞を、ヌクレオシドを含まないが80nMのメトトレキサート(mtx)を含む培地で成長させ、トランスフェクションしたdhfrとV1V2J4ミニ遺伝子の可能性ある増幅のために選択した。8nMのmtx中で2週間後、活発的に成長する細胞を明らかに認めた。欠失変異株(deletion mutants)の発現を調べるため各ウェル又はコロニーを葉密的に分析し、更に増幅のために選択したものを上に記載したのと同じ密度で24ウェル培養プレートにシードした。高レベルのV1V2J4を発現する多数のサブポピュレーションをmtxのレベルを増加しながら成長させ、dhfr転写単位とT4184(V1V2-J4)ミニ遺伝子を更に増幅させるため選択した。いくつかの細胞系

をこのようにして誘導した。これらは少なくとも約2pg/cell/24hrsの量で欠失変異株を発現する。

mtx選択条件下に850 cdlローラーボトル中に拡張した付着細胞培養物から血清を含まない培地(CM)を調製した。集密的に細胞を、 Mg^{2+} と Ca^{2+} を含まないリン酸緩衝サリン(PBS)で2回洗浄し、成長培地(ハイポキサンチンとチミジンを含まないHam'sF12, 10%ウシ胎児血清, 100単位/mlのペニシリン, ストレプトマイシン, および選択的濃度のmtx)を、血清とmtxを除き 1×10^{-5} IUS(インシュリン, トランスフェリン, セレニウム(Colaborative Research Inc.))を加えた同じ培地に置き換えた。24~48時間後培地を取り除き、選択的成長培地に変えた。血清非含有培地を次いで3~5日間以内に再び加え、このサイクルを無限に、すなわち2ヶ月以上繰り返した。CMを8000gの遠心分離にかけてきれいにした。プロテアーゼ阻止剤PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を0.5mMに加え、圧力膜フィルターでCMを10倍に濃縮した。この濃縮CMを2000gの遠心分離にかけてきれいにし、プロテアーゼ阻害剤であるアプロチニン(ミズーリー州セントルイス市のSigma Chemical)を5 μ g/mlの最終濃度に加

えた。サンプルを直接処方するか又は-70℃で貯蔵した後処方した。

ウェスタンブロット分析: V1V2J4生産CHO細胞からの培地を濃縮し、15%ポリアクリルアミド還元ゲルにかけた。蛋白質をニトロセルロース紙に移し、編成E. Coli誘導¹⁰T₄-NSI融合分子に対するポリクローナル抗血清で検出した。この抗血清は、約25kdで移動するV1V2J4ダブレットを特異的に認識する。これは、リーダープロセッシング後のV1V2J4コードシークエンスの予想されたサイズに相当する。このダブレットの物理的な根拠は明らかでない。これはN-リンクしたグリコシレーションの差から生じたものとも思われない。ただし、このグリコシレーションのためのT-4における2つのコンセンサスシークエンスはV1V2J4に存在しないからである。

免疫エпитープ: モノクローナル抗体OKT₄及び、OKT-4A, OKT-4B, OKT4C, OKT4D, OKT4EとOKT4Fは、生来の膜結合T-4レセプター上の表面エпитープを特異的に認識する(Raoら, Cell Immunol., 80, 310 (1983))。これらの抗体は、免疫ブロット

アッセイにおいて、還元された、SDS変性タンパクに結合しない生来のコンフォメーションに対して特異的である。以下の免疫析出法を用いて³⁵S-ラベル培養上清から、双方の抗体が特異的にV1V2J4を析出することが明らかになった。

V1V2J4を生成する細胞を60mmの培養皿あたり 1×10^6 細胞含有する培養物を、1.5 mlのメチオニン及びシステインを含まず、1 IUS及び170 μ Cl/mlの [³⁵S]メチオニンと30 μ Cl/mlの [³⁵S]システイン(ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA)を含むF12培地中、37℃で18時間ラベル処理した。透明培地(100 μ l)を等量の析出バッファー(10mMリン酸ナトリウムpH7.5(100mM NaCl), 0.1%NP-40, 0.5%無脂肪ドライミルク)で希釈し、3 μ gのウサギIgGと共に4℃で15分間インキュベートした。その後、30 μ l(充填容量)のタンパクAセファロースビーズ(Pharmacia P-L Biochemicals)で4℃にて30分間処理した。予め清澄化した上清を、各々5 μ gの上記したOKT₄抗体、マウスIgG(Cooper Biomedical, Malvern, PA)、あるいはウサギ α -マウスIgG(Cooper Biomedical)と共に4℃にて30分間インキュベートした。OKT₄抗体、マウスIgG及びウサギ α -マ

ウス1g Gを、20 μ l (充填容量)のタンパクAセファロース
ビーズと共に4℃で30分間インキュベートして析出させた。析
出ののち、ビーズを、200 μ lの析出バッファーで2回、200
 μ lの析出バッファーからNP-40^{*}及び無脂肪ドライミルク
を除いた溶液で1回洗浄した。洗浄したビーズを20 μ lのサン
プルバッファー(125mM トリス-HCl, pH6.8, 20%グリセ
リン, 1.4 M β -メルカプトエタノール)中で5分間煮沸し、
その上清を12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳
動により分析した。OKT₄を除いて、モノクローナル抗体の
各々は、³⁵Sでラベルした培養上清からV1V2J4を特異的
に析出させた。

HIV結合の融合

OKT₄AによるV1V2^J4の認識は、V1V2^J4が
AIDSウィルスの感受性細胞に対する結合を阻害するであろ
うということを示した。V1V2^J4を含有するかまたはそれ
を欠如するCMを最初のアッセイに使用した。HIVをCMと
共にインキュベートし、T-4⁺CEMセルラインに対するウ
ィルスの結合は、McDougalら、supra(1985)に記載のようにし
て、FITC結合抗-HIV抗体とのインキュベーションおよ

びFACS (フルオレセイン活性化セルソーター) 分析により
定量化した。V1V2J4を生産するセルラインに由来する
CMは希釈度依存的にHIV結合を阻害したが、調和した
(matched)非生産(DXB-11)細胞に由来するCMではなん
らの応答も見られなかった。

タンパクV1J4はCHO細胞中で同様に発現した。しかし、
これらの予備実験において、明らかにこのタンパクは培地中
には輸送されなかった。他の組換え有機体で生産されたV1J4
がOKT₄Aに結合することを示す別の研究によると、哺乳動
物の細胞培養で発現されたV1J4はHIV結合を阻害するだ
ろうと思われる。

実施例5: 可溶性のT₄断片抗体の調整

完全フロイントアジュバントに1:1の容量で入れた本発明
の精製可溶性T₄断片(上記のようにして調製)50 μ gを8週
齢のBalb/cマウスの腹腔内に注射する。その後一月毎に不完全
フロイントアジュバントと混合した可溶性T₄断片をマウスに
ブーストし、尾静脈を通して採血する。血清のイムノグロブリン
画分を硫酸アンモニウム沈澱により作成し、固定化したT₄
断片を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって特定

の抗-可溶性T₄断片抗体を精製する。

実施例6: 可溶性T₄断片抗-イディオタイプ抗体の調製

完全フロイントアジュバントに入れた本発明の精製抗-可溶性
T₄断片抗体(上記のようにして調製)50 μ gを遺伝子組成が
同じで同属のマウスの腹腔内に注射し、不完全フロイントアジ
ュバントに入れた抗-可溶性T₄断片抗体を毎月ブーストする。
融合の4日前、3日前および2日前に、生理食塩水に入れたイ
ムノグロブリン50 μ gをマウスの静脈内にブーストする。次に、
既に記載されており本発明に係る分野で公知の手順に従って、
脾細胞をP3X63 AG8.653 非分泌性ミエロマ細胞と融合する。
2週間後、ハイブリドーマの上清の抗-可溶性T₄断片抗体に
対する結合能をラジオイムノアッセイによってスクリーニング
する。次いで、陽性のクローンについて、ヒト免疫不全ウィル
スエンベロープ糖タンパクおよびAIDSウィルスに対して結
合する能力を検定する。また、「ワンステップ」法を用いて、
完全フロイントアジュバントに入れた可溶性T₄断片をマウス
の腹腔内に注射し、生理食塩水に入れた可溶性T₄断片を静脈
内にブーストし、そして上記のようにしてマウス脾細胞をミエ
ロマと融合する。その後、ハイブリドーマの上清を、可溶性

T₄断片抗-イディオタイプ抗体に関して検定する。

下記の文献は明細書中に引用されたものである：

REFERENCES

1. E.L. Reinherz et al., "Discrete Stages of Human Intrathymic Differentiation: Analysis of Normal Thymocyte and Leukemic Lymphoblasts of T Cell Lineage", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1588-1592 (1980).
2. E.L. Reinherz and S.F. Schlossman, "The Differentiation and Function of Human T Lymphocytes", *Cell* **19**: 821-827 (1980).
3. M.L. Blue et al., "Coexpression of T4 and T8 on Peripheral Blood T Cells Demonstrated by Two-color Fluorescence Flow Cytometry", *J. Immunol.* **134**: 2281-2286 (1985).
4. E.G. Engleman et al., "Activation of Human T Lymphocyte subsets: Helper and Suppressor/Cytotoxic T Cells Recognize and Respond to Distinct Histocompatibility Antigens", *J. Immunol.* **127**: 2124-2129 (1981).
5. A.M. Krensky et al., "Long-term Human Cytolytic T-cell Lines Allospecific for HLA-DR6 Antigen Are OKT4⁺", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 2365-2369 (1982).
6. S.C. Meuer, S.F. Schlossman and E. Reinherz, "Clonal Analysis of Human Cytotoxic T Lymphocytes T4⁺ and T8⁺ Effector T Cells Recognize Products of Different Major Histocompatibility Complex Regions", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4395-4399 (1982).
13. L. Rogozinski et al., "The T4 Surface Antigen is Involved in the Induction of Helper Function", *J. Immunol.* **132**: 735-739 (1984).
14. S.L. Swain, "Significance of LYT Phenotypes: LYT2 Antibodies Block Activities of T Cells that Recognize Class I Major Histocompatibility Complex Antigens Regardless of Their Function", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7101-7105 (1981).
15. U. Landegren et al., "Selective Inhibition of Human T Cell Cytotoxicity at Levels of Target Recognition of Initiation of Lysis by Monoclonal OKT3 and Leu-2a Antibodies", *J. Exp. Med.* **155**: 1579-1584 (1982).
16. R.M. Zinkernagel and R.C. Doherty, "MHC-restricted Cytotoxic T Cells: Studies on the Biological Role of Polymorphic Major Transplantation Antigens Determining T Cell Restriction, Specificity, Function, and Responsiveness", *Adv. Immunol.* **27**: 52-177 (1979).
17. J. Kappler et al., "The Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Receptor on T Cells in Mouse and Man: Identification of Constant and Variable Peptides", *Cell* **35**: 295-302 (1983).
18. O. Acuto et al., "The Human T Cell Receptor: Appearance in Ontogeny and Biochemical Relationship of Alpha and Beta Subunits on IL-2 Dependent clones and T Cell Tumors", *Cell* **34**: 717-725 (1983).
7. W.Z. Biddison et al., "Possible Involvement of the OKT4 Molecule in T Cell Recognition of Class II HLA Antigens", *J. Exp. Med.* **156**: 1065-1076 (1982).
8. D.R. Wilde et al., "Evidence Implicating LJT4 in Class II MHC Antigen Reactivity Monoclonal Antibody GK 15 (Anti-LJT4) Blocks Class II MHC Antigen-Specific Proliferation, Release of Lymphokines and Binding by Cloned Murine Helper T Lymphocyte Lines", *J. Immunol.* **131**: 2178-2183 (1983).
9. S.L. Swain, "T Cell Subsets and the Recognition of MHC Class", *Immunol. Rev.* **74**: 129-142 (1983).
10. Y. Thomas et al., "Functional Analysis of Human T Cell Subsets Defined by Monoclonal Antibodies. IV. Induction of Suppressor Cells Within the OKT4⁺ Population", *J. Exp. Med.* **154**: 459-467 (1981).
11. E.G. Engleman et al., "Antibodies to Membrane Structures that Distinguish Suppressor/Cytotoxic and Helper T Lymphocyte Subpopulations Block the Mixed Leukocyte Reaction in Man", *J. Exp. Med.* **154**: 193-198 (1981).
12. P. Marrack et al., "The Major Histocompatibility Complex-restricted Antigen Receptor on T Cells. II. Role of the LJT4 Product", *J. Exp. Med.* **158**: 1077-1091 (1983).
19. P. Kavathas et al., "Isolation of the Gene Coding for the Human T Lymphocyte Antigen Leu-2 (T8) by Gene Transfer and cDNA Subtraction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7688-7692 (1984).
20. D.R. Littman et al., "The Isolation and Sequence of the Gene Encoding T8: A Molecule Defining Functional Classes of T Lymphocytes", *Cell* **40**: 237-246 (1985).
21. V.P. Sukhatma et al., "The T Cell Differentiation Antigen Leu-2/T8 is Homologous to Immunoglobulin and T Cell Receptor Variable Regions", *Cell* **40**: 591-597 (1985).
22. S.M. Friedman et al., "OT-CLL: A Human T Cell Chronic Lymphocytic Leukemia That Produces IL-2 in High Titer", *J. Immunol.* **128**: 935-940 (1982).
23. D.A. Thurley-Lavon, L. Chess and J.L. Strominger, "Suppression of In Vitro Epstein-Barr Infection: A New Role for Adult Human T Cells", *J. Exp. Med.* **146**: 495-508 (1977).
24. J.W. Goding, "The Chronic Chloride Method of Coupling Antigens to Erythrocytes: Definition of Some Important Parameters", *J. Immunol. Methods* **10**: 61-66 (1976).
25. F.L. Graham and A.J. van der Eb, "A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus DNA", *Virology* **52**: 456-467 (1973).

26. M. Wigler et al., "Biochemical Transfer of Single-Copy Eucaryotic Genes Using Total Cellular DNA as Donor", *Cell* **14**: 725-731 (1978).
27. M. Wigler et al., "Transfer of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene to Cultured Mouse Cells", *Cell* **11**: 223-232 (1977).
28. J.M. Chirgwin et al., "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease", *Biochemistry* **18**: 5294-5299 (1979).
29. H. Aviv and P. Leder, "Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic Acid-Cellulose", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1408-1412 (1972).
30. T. Huynh, R.A. Young and R.W. Davis, "Construction and Screening cDNA Libraries in *gt10* and *gt11*", DNA Cloning Techniques - A Practical Approach, D.M. Glover, ed. (Oxford: IRL Press), in press.
31. T. Maniatis et al., "The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eucaryotic DNA", *Cell* **15**: 687-701 (1978).
32. M.M. Davis et al., "Cell-Type-Specific cDNA Probes and the Murine I Region: the Localization and Orientation of A² Alpha", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2194-2198 (1984).
- Cell **34**: 865-879 (1983).
41. C. Terhorst et al., "Further Structural Studies of the Heavy Chain of MHA Antigens and Its Similarity to Immunoglobulins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4002-4006 (1977).
42. J.A. Medo, L.C. Harrison and J. Roth, "Binding of Insulin Receptors to Lectins: Evidence for Common Carbohydrate Determinants on Several Membrane Receptors", *Biochemistry* **20**: 3385-3393 (1981).
43. U.K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature* **227**: 680-685 (1970).
44. R. Mann, R.C. Mulligan, and D. Baltimore, "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus", *Cell* **33**: 153-159 (1983).
45. F. Barre-Sinoussi, et al., "Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)", *Science* **220**: 868-871 (1983).
46. J.S. McDougal, et al., "Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen", *J. Immunol.* **133**: 3151-3162 (1985).
47. J.S. McDougal, et al., "Immunoassay for the detection and quantitation of infectious human retrovirus, lymphadenopathy-associated virus (LAV)", *J. Immunol. Meth.* **76**: 171-183 (1985).
33. T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory) (1982).
34. P.W.J. Rigby et al., "Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity In Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I", *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251 (1977).
35. J. Vieira and J. Messing, "The pUC Plasmids, an M13mp7-Derived System for Insertion Mutagenesis and Sequencing with Synthetic Universal Primers", *Gene* **19**: 259-268 (1982).
36. F. Sanger, S. Nicklen and A. Coulson, "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467 (1977).
37. E. Southern, "Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517 (1975).
38. G.M. Church and W. Gilbert, "Genomic Sequencing", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995 (1984).
39. R.H. Scheller et al., "A Family of Genes that Codes for ELK, a Neuropeptide Eliciting a Stereotyped Pattern of Behavior in Aplysia", *Cell* **28**: 707-719 (1982).
40. K. Finn, D. DiMaio and T. Maniatis, "Identification of Two Distinct Regulatory Regions Adjacent to the Human Beta-Interferon Gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995 (1984).
48. J.S. McDougal, et al., "Binding of HTLV-III/LAV to T₄⁺ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule", *Science* **231**: 382-385 (1986).
49. C.B. Reiner, et al., "Standardization of ligand binding assays for alpha-fetoprotein. In Immunofluorescence and Related Staining Techniques. W., Knapp, K. Holubar, and G. Wick, eds. (Amsterdam:Elsevier/North Holland Press) p. 169 (1978).
50. M.B. Wilson and P.K. Nakane, "Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp, K. Holubar, and G. Wick, eds. (Amsterdam:Elsevier/North Holland Press), p. 215 (1978).
51. J. Porath, R. Axen, and S. Ernback, "Chemical coupling of proteins to agar", *Nature* **215**: 1491-1493 (1967).
52. B.J. Polesz, et al., "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7415-7419 (1980).
53. P. Clapham, K. Nagy, and R.A. Weiss, "Pseudotypes of human T-cell virus types 1 and 2:

- Neutralization by patients' sera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2886-2889 (1984).
54. A.G. Dalgleish, et al., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature* **312**, 763-766 (1984).
 55. M. Popovic, et al., Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS, *Science* **224**, 497-500 (1984).
 56. K. Nagy, et al., Human T-cell leukemia virus type 1: induction of syncytia and inhibition by patients' sera, *Int. J. Cancer* **32**, 321-328 (1983).
 57. D.M. Neville and H. Glossman, Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate, *Methods Enzymol.* **32**, 92-102 (1974).
 58. A. Helenius, et al., On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells, *J. Cell. Biol.* **84**, 404-420 (1980).
 59. R.D. Cone and R.C. Mulligan, High-efficiency gene transfer into mammalian cells: Generation of helper-free recombinant retroviruses with broad mammalian host range, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6345-6349 (1984).
 - Ekblom, eds. (New York: Academic Press), in press (1984).
 68. L.M. Anzel and R.J. Poljak, "Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins", *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 961-997 (1979).
 69. P.Y. Chou and G.D. Fasman, "Empirical Predictions of Protein Conformation", *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 251-276 (1978).
 70. P.J. Maddon, et al., The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: A new member of the immunoglobulin gene family, *Cell* **42**, 93-104 (1985).
 71. R.A. Adams, A. Flowers and B.J. Davis, Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2, *Can. Res.* **28**, 1121-1125 (1968).
 72. G.O. Gey, W.D. Coffman and M.T. Kubicek, Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, *Cancer Res.* **12**, 264-265 (1952).
 73. R.J.V. Pulvertaft, Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma), *Lancet* **I**, 238-240 (1964).
 74. M.J. Dimmock, Initial stages of infection with animal viruses, *J. Gen. Virol.* **33**, 1-22 (1982).
 60. F.W. Alt et al., "Probes for Specific mRNAs by Subtractive Hybridization: Anomalous Expression of Immunoglobulin Genes", in *Eucaryotic Gene Regulation*, R.Axel, T.Manias and C.F. Fox, eds. (New York: Academic Press), pp. 407-419 (1979).
 61. M. Kozak, "Comparison of Initiation of Protein Synthesis in Prokaryotes, Eucaryotes and Organelles", *Microbiol. Rev.* **47**: 1-45 (1983).
 62. L. Hood, M. Kronenberg and T. Hunkapiller, "T Cell Antigen Receptors and the Immunoglobulin Supergene Family", *Cell* **40**: 225-229 (1985).
 63. S. Tonegawa, "Somatic Generation of Antibody Diversity", *Nature* **302**: 575-581 (1983).
 64. J. Kyte and R.F. Doolittle, "A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein", *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132 (1982).
 65. G. von Heijne, "Patterns of Amino Acids Near Signal-Sequence Cleavage Sites", *Eur. J. Biochem.* **133**: 17-21 (1983).
 66. E.A. Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services), p. 281 (1983).
 67. A.F. Williams et al., "Cell Surface Glycoproteins and the Origins of Immunity", in the Proceedings of the Sigrid Juselius Symposium, L.C. Andersson, C.G. Gahrberg and P. J. White, M. Kielian and A. Helenius, Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses, *Quart. Rev. Biophys.* **16**, 151-195 (1983).
 76. M. Marsh, The entry of enveloped viruses into cells by endocytosis, *Biochem. J.* **218**, 1-10 (1984).
 77. M. Kielian and A. Helenius, Entry of alphaviruses. In the Togaviridae and Flaviviridae, S. Schlesinger and M.J. Schlesinger, eds., (Plenum Publishing Corp.), pp. 91-119 (1986).
 78. S. Ohkuma, and B. Poole, Fluorescence probe measurements of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3327-3331 (1978).
 79. F.R. Maxfield, Weak bases and ionophore rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts, *J. Cell. Biol.* **95**, 676-681 (1982).
 80. A. Helenius, M. Marsh, and J. White, Inhibition of Semliki Forest virus penetration by lysosomotropic weak bases, *J. Gen. Virol.* **58**, 47-61 (1982).
 81. R.T. Johnson and J.C. McArthur, AIDS and the brain, *TINS* **9**, 51-54 (1986).

82. P.M. Snow, M. Van de Rijn and C. Terhorst, "Association Between the Human Thymic Differentiation Antigens T6 and T8", *Eur. J. Immunol.*, in press (1985).
83. P.M. Snow and C. Terhorst, "The T8 Antigen is a Multimeric Complex of Two Distinct Subunits on Human Thymocytes but Consists of Homomultimeric Forms on Peripheral Blood T Lymphocytes", *J. Biol. Chem.* 258: 14675-14681 (1983).
84. C. Terhorst et al., "Biochemical Analysis of Human T Lymphocyte Differentiation Antigens T4 and T5", *Science* 209: 520-521 (1980).
85. W.H. Hildemann, "Immunocompetence and Allo-geneic Polymorphism Among Invertebrates", *Transplantation* 27: 1-3 (1979).
86. V.L. Scofield et al., "Protochordate Allor-recognition is Controlled by a MHC-like Gene System", *Nature* 295: 499-502 (1982).
87. T.L. Lents, et al., Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?, *Science* 215, 182-184 (1982).
88. J.D. Fingereth, et al., Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the CR2 receptor CR2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4510-4514 (1984).
89. P.E. Tambourin, et al., The physiopathology of Friend leukemia, *Leukemia Res.* 1, 117-129 (1979).
90. A. Oliff, et al., Isolation of transplantable erythroleukemia cells from mice infected with helper-independent Friend murine leukemia virus, *Blood* 58, 244-254 (1981).
91. J.E. Silver and J.M. Fredrickson, Susceptibility to Friend helper virus leukemias in CXB recombinant inbred mice, *J. Exp. Med.* 158, 1693-1702 (1983).
92. P.A. Chatis, et al., Role for the 3' end of the genome in determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4408-4411 (1983).
93. P.A. Chatis, et al., A 3' end fragment encompassing the transcriptional enhancers of nondefective Friend virus confers erythro-leukemogenicity on Moloney leukemia virus, *J. Virol.* 52, 248-254 (1984).
94. A. Bosze, H.J. Thiesen and P. Charnay, A transcriptional enhancer with specificity for erythroid cells is located in the long terminal repeat of the Friend murine leukemia virus, *EMBO J.* 3, 1615-1623 (1986).
95. A.N. Barclay, et al., Immunoglobulin-related structures associated with vertebrate cell surfaces, in press.
96. M.O. Dayhoff, W.C. Barker and L.T. Hunt, Establishing homologies in protein sequences. In *Methods in Enzymology. Enzyme Structure Part I*, C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, eds. (New York: Academic Press), pp. 524-545 (1983).
97. Y. Yanagi, et al., A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains, *Nature* 308, 145-149 (1984).
98. G.K. Sin, et al., Primary structure of human T-cell receptor α -chain, *Nature* 312, 771-775 (1984).
99. H. Saito, et al., A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes, *Nature* 312, 36-40 (1984).
100. H. Saito, et al., Complete primary structure of the E chain and gene of the mouse major histocompatibility complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5520-5524 (1983).
101. M. Isobe, et al., The gene encoding the T-cell surface protein T4 is located on human chromosome 12, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4399-4402 (1986).
102. J.M. Roberts and R. Axel, Gene Amplification and Gene Correction in Somatic Cells, *Cell* 23, 105-115 (1982).
103. D.S. Pfarr, G. Sathe and M.E. Reff, A Highly Modular Cloning Vector for the Analysis of Eucaryotic Genes and Gene Regulatory Elements, *DNA*, 3, 461-467 (1985).
104. G. Urlaub and L.A. Chasin, Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216-4220 (1980).
105. Gay, D. et al., *Nature* 328: 626-629 (1987).
106. Sleckman, B.D. et al., *Nature* 328: 351-353 (1987).
107. Yanisch-Perron, et al., *Gene* 31: 103 (1985).
108. Berg, P., et al. *Mol. Cell. Biol.* 3: 246 (1983).
109. Subramani, et al., *Mol. Cell Biol.* 1: 854 (1981).
110. Frayne, et al., *Mol. Cell Biol.* 4: 2921 (1984).
111. Schunperli, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 257 (1982).
112. Gross, et al., *Mol. Cell Biol.* 5: 1015 (1985).
113. Pfarr, et al., *DNA* 5: 115 (1985).
114. Rao, et al., *Cell Immunol.* 80: 310 (1983).

115. McClure, et al., Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation 9: 345 (1982).
116. Urlaub, et al., Cell 33: 405 (1983).
117. Kim, et al., Cell 42: 129 (1987).
118. Wigler, et al., PNAS USA 76: 1373 (1979).
119. Copeland, et al., Cell 17: 993 (1979).
120. Sattentau, et al., Science 234: 1120 (1986).
121. Greenstein, et al., Ann. Inst. Pasteur 138: 134 (1987).
122. Gay, et al., Ann. Inst. Pasteur 138: 127 (1987).

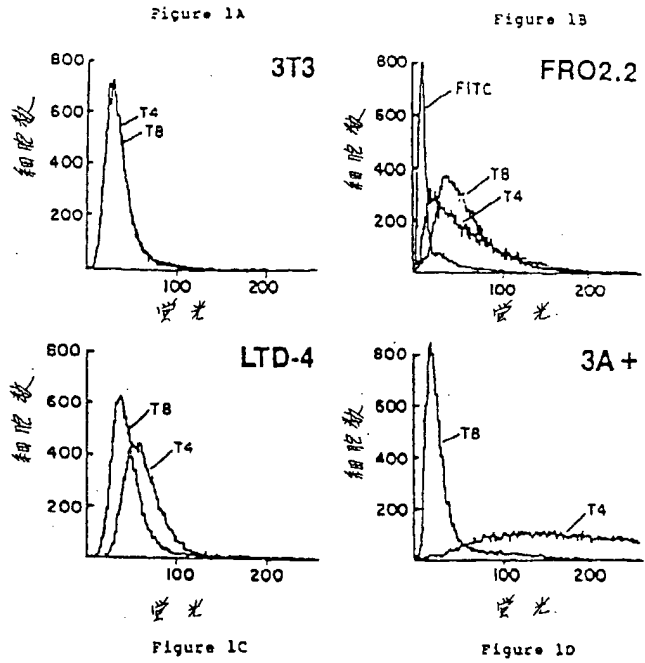


FIGURE 2

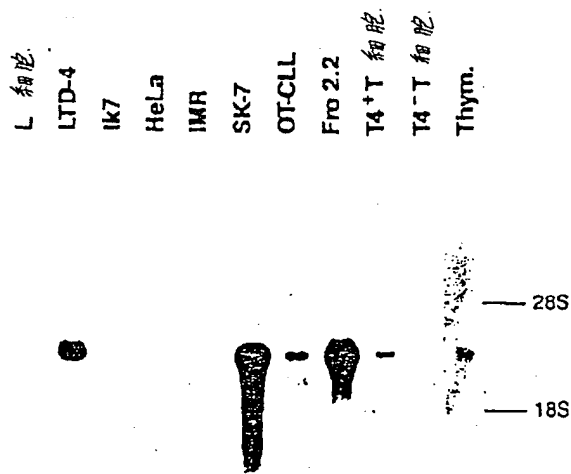


Figure 3A

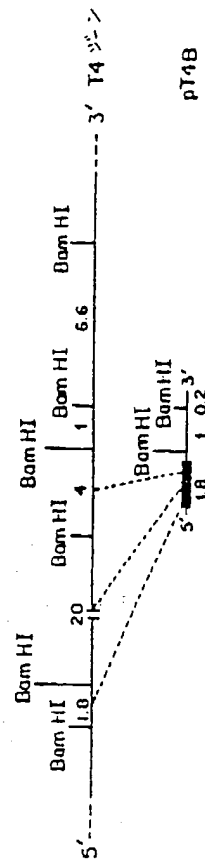


Figure 3B

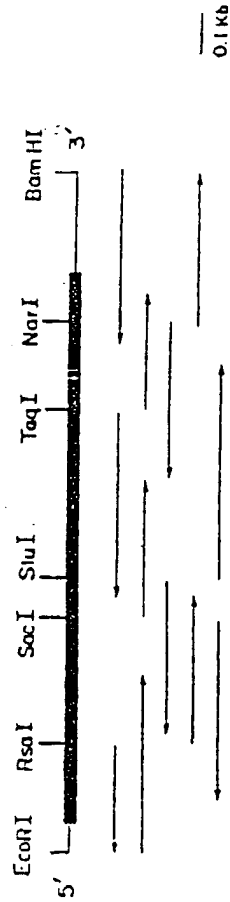


Figure 3C₁

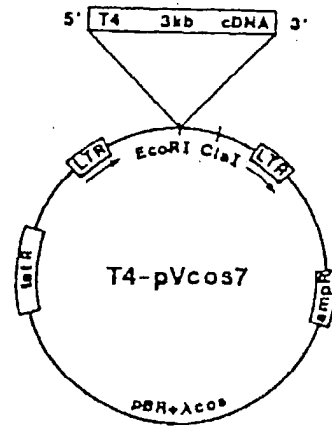


Figure 3C₂

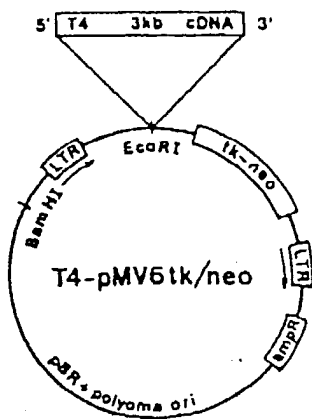


FIGURE 4.

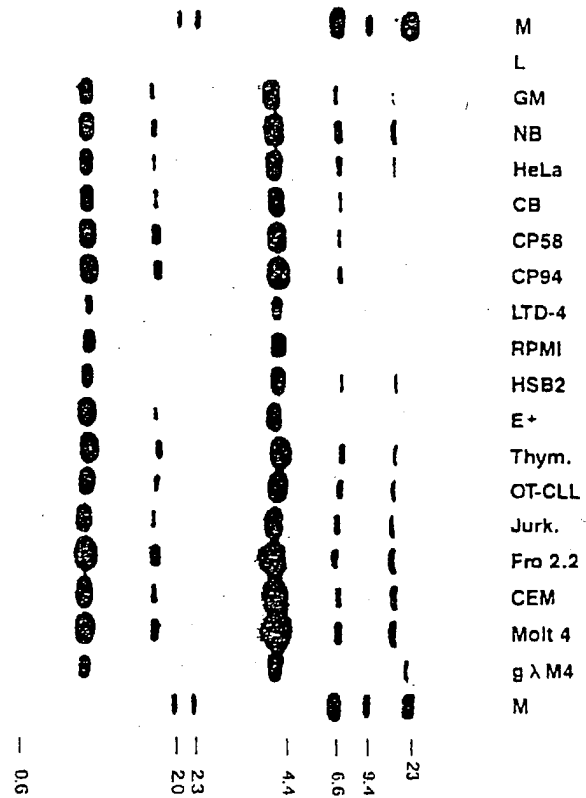


Figure 5B₂

+250
gln asp pro lys leu gln met gly lys lys leu pro leu his
CAG GAC CCT AAG CTC CAG ATG GGC AAG AAG CTC CCG CTC CAC 918
----- V3 -----

+280
thr leu ala leu glu ala lys thr gly lys leu his gln glu
AOC CTC GGC CTT GAA GGG AAA ACA GGA AAG TTG CAT CAG GAA 1009

+310
cys glu val trp gly pro thr ser pro lys leu met leu ser
TCT CAG GTG TGG GGA GGC ACC TCC CCT AAG CTC ATG CTC ACC 1098

+340
val trp val leu asn pro glu ala gly met trp gln cys leu
GTG TGG GTG CTC AAC CCT GAG CCG GCG ATG TGG CAG TGT CTC 1188
----- V4 -----

+370
pro thr trp ser thr pro val gln pro met ala leu ile val
GCT ACA TGG TCC ACC CCG GTG CAG CCA ATG GGC CTC ATT GTG 1278

+400
phe cys val arg cys arg his arg arg arg gln ala glu arg
TTC TGT GTC AGC TCC CCG CAC CCA ACC GGC CAA CCA GAG CCG 1368
----- CYT -----

+430
pro his arg phe gln lys thr cys ser pro ile ---
CCT CAC CCG TTT CAG AAG ACA TGT ACC GGC ATT TGA GGCACGA 1459
----- CYT -----

ACATCAATGTATCAGAGCCACCGCTCTGCGCTGCTGTTCTGCTGCTTACAATTG 1578

GGCTTAATCAGACCGTCTGCTGACGGCAATTGCTTTTCTCTTCAAGCGCTAGCGCTTCT 1697

FIGURE 7

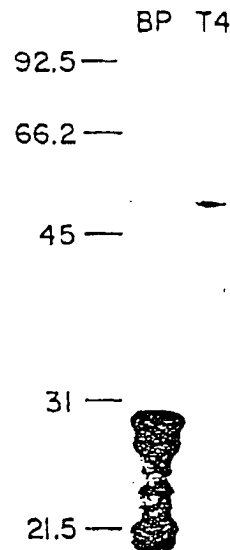


Figure 8

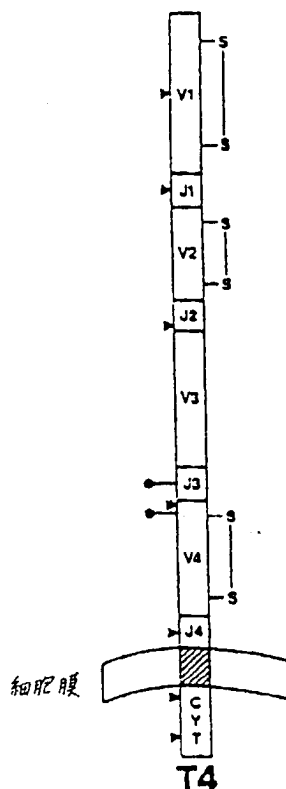


Figure 9A₁

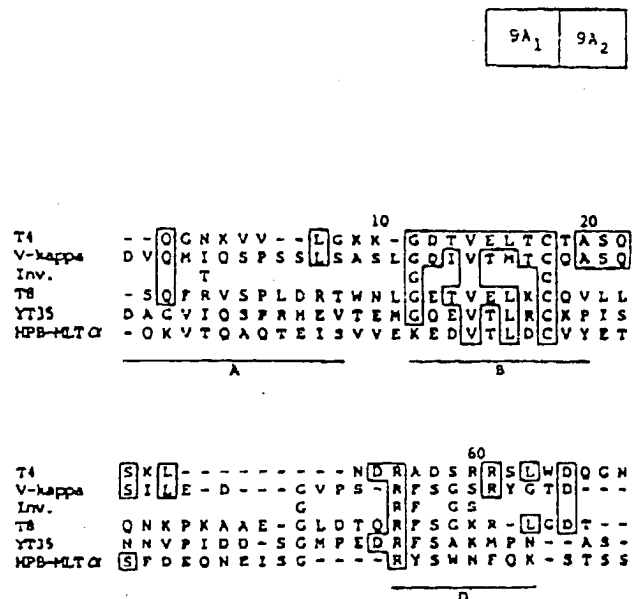


Figure 9A₂

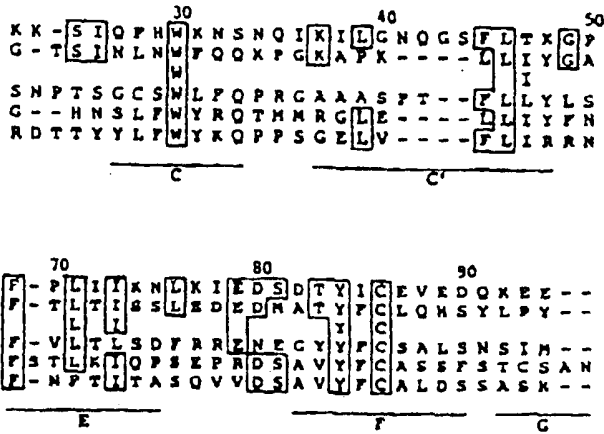


Figure 9B

T4 J

KPB-MTQJ

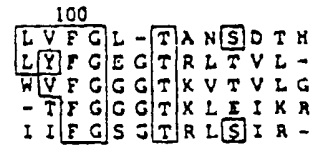


Figure 9C

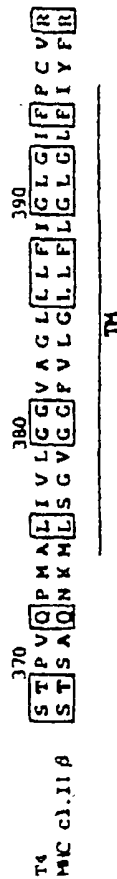


Figure 10

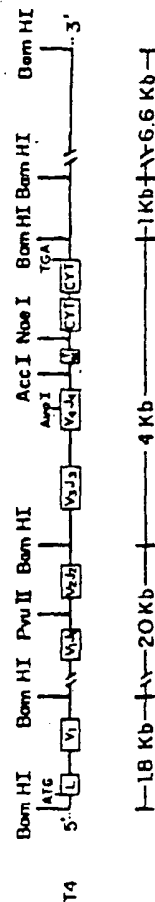


Figure 11A₂

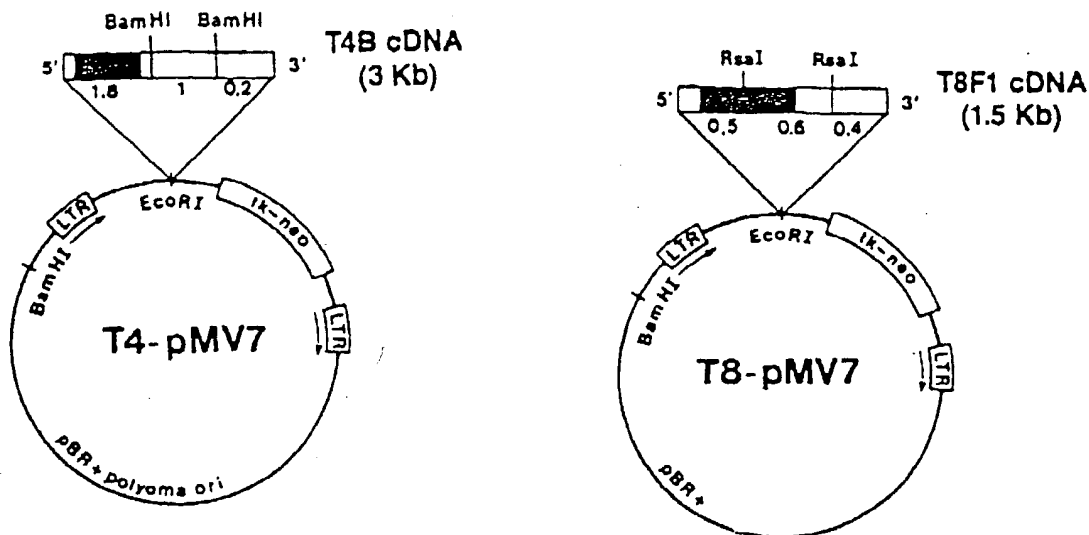


Figure 11B₁

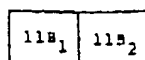


Figure 11B₂

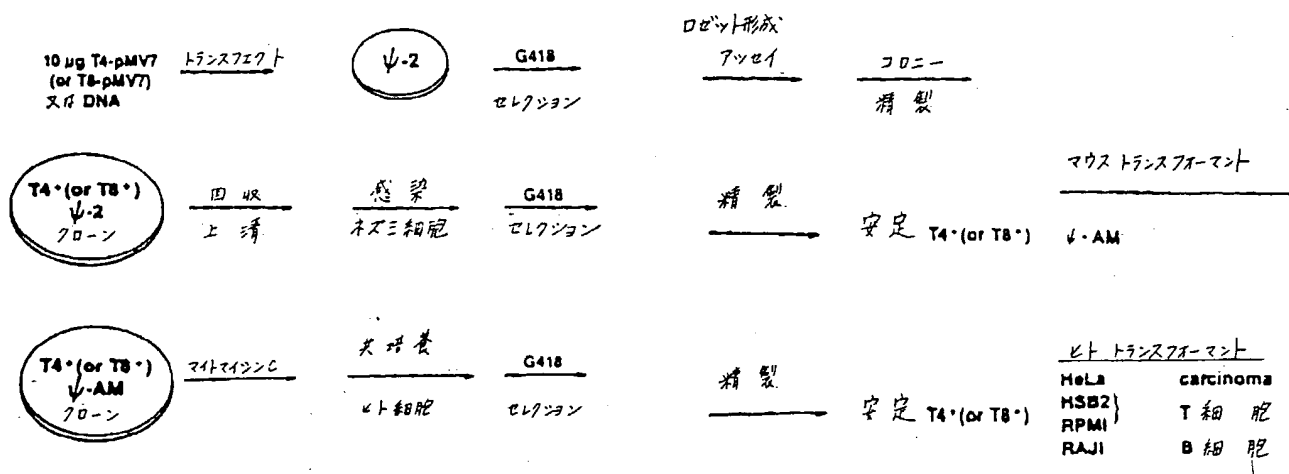


Figure 12

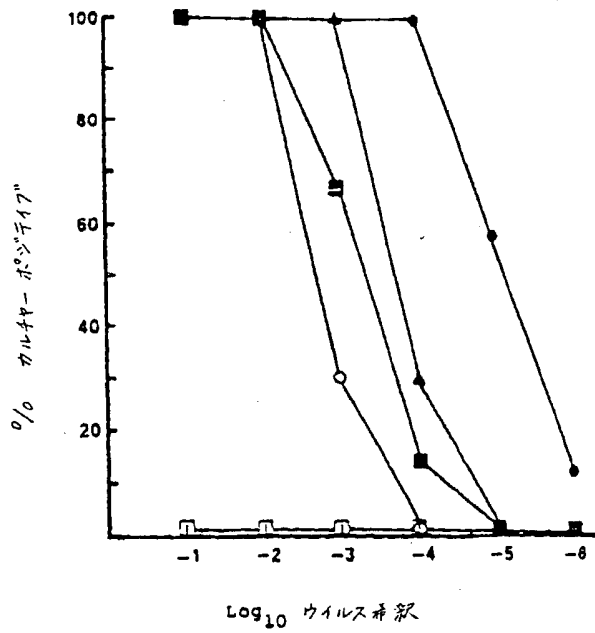


FIGURE 13A

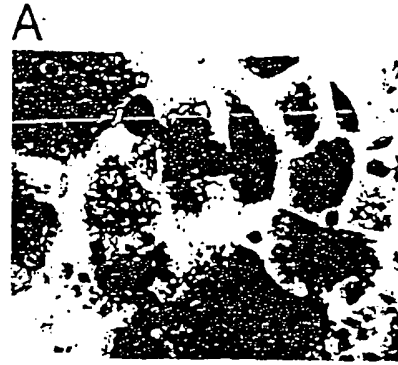
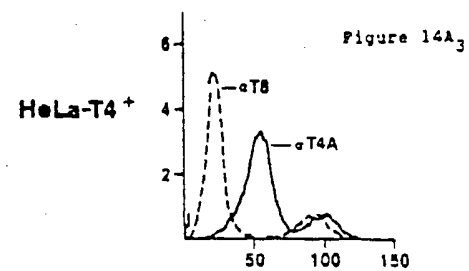
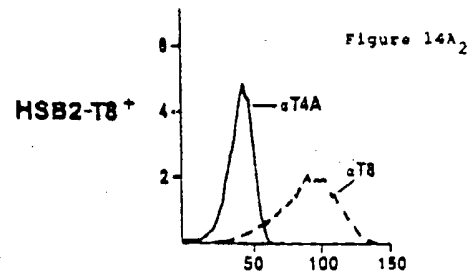
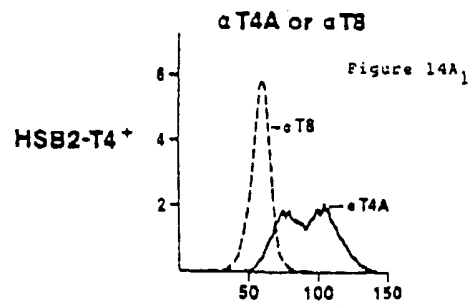


FIGURE 13B



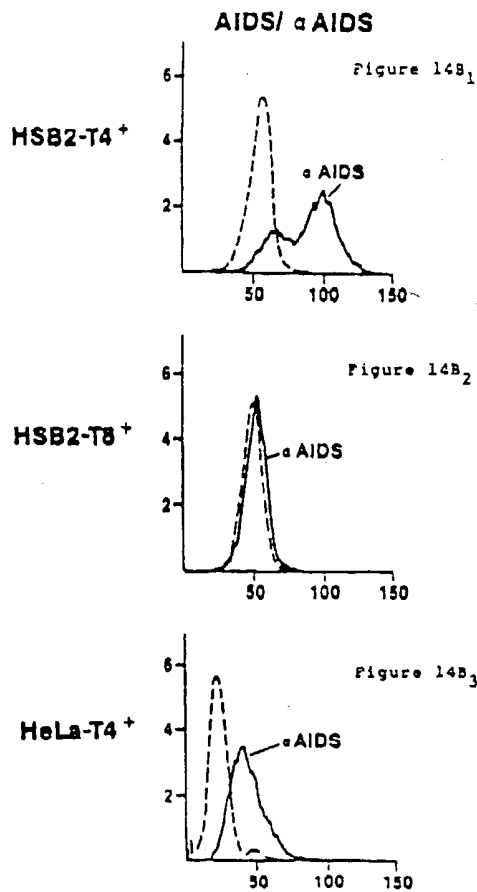


FIGURE 15A

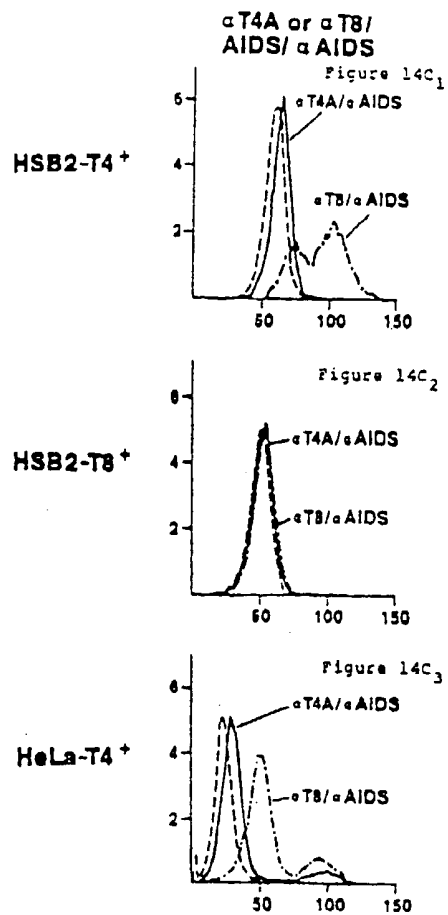


FIGURE 15B

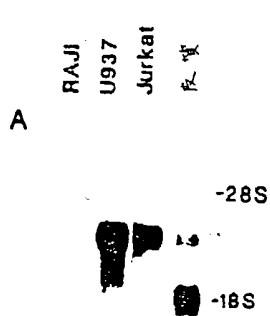


Figure 16

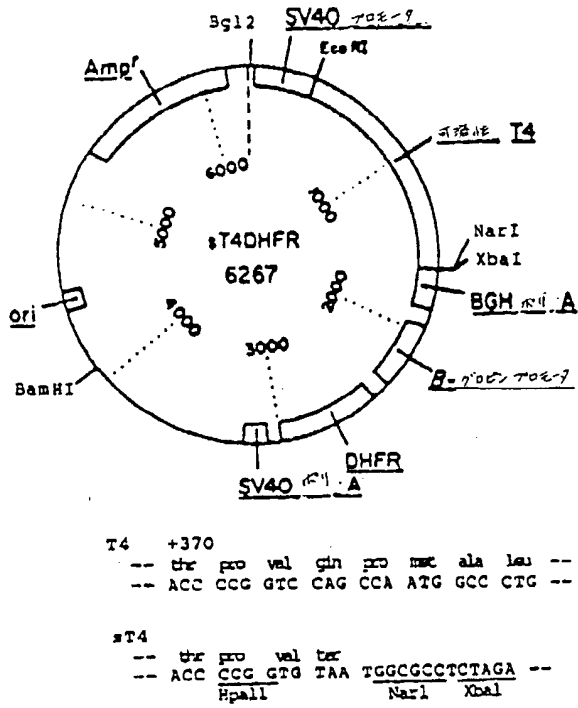


Figure 18A

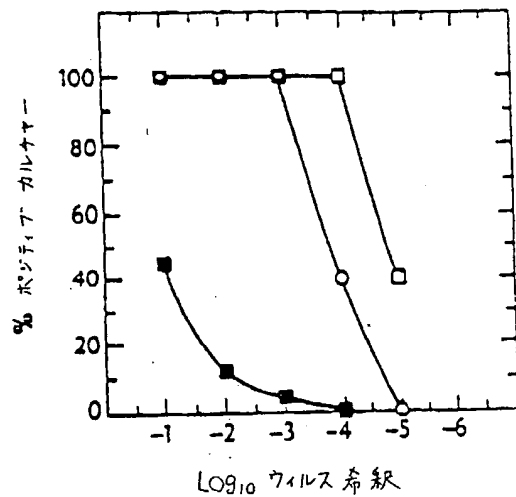


Figure 17

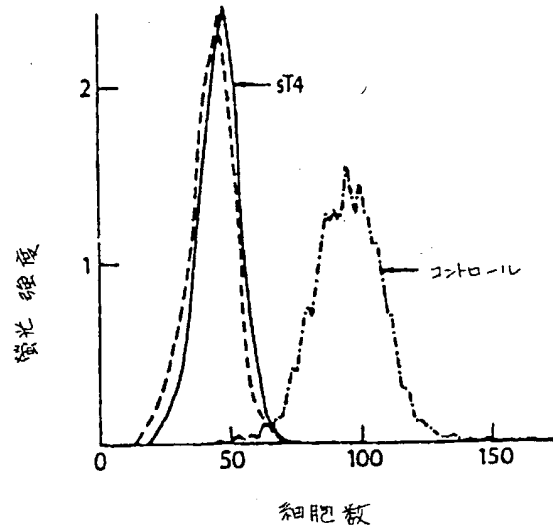
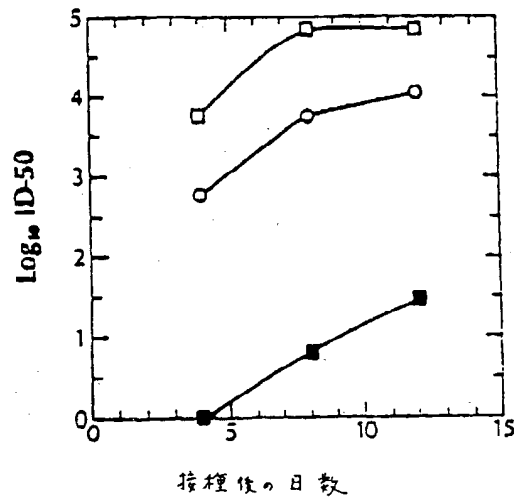


Figure 18B



手続補正書

Figure 18C

平成元年11月30日

特許庁長官 古田 文 殿

1. 事件の表示 PCT/US 89/00762

2. 発明の名称 可溶性T4の誘導体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 ザ・トラステイズ・オブ・コロンビア・
ユニヴァーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・
ニューヨーク (ほか1名)

4. 代理人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号160) 電話(03) 354-8623
(6200) 弁理士 川口 義雄 (ほか2名)

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正により増加する発明の数 なし

7. 補正の対象 明細書の翻訳文及び請求の範囲の翻訳文の両

8. 補正の内容

(1) 鮮明な明細書の翻訳文及び鮮明な請求の範囲の翻訳文を
別紙の通り補充する。

方式 (審判) 審決



国際調査報告

International Application No. PCT/US89/00762

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER in general classification systems (IPC, etc.) According to International Patent Classification (IPC) or to any other classification system (IPC) Int. Cl. 4 - C12N 7/00; A61K 37/02; C07K 15/00 U.S. Cl. - 435/240.1, 435, 320; 424/89; 514/12; 520/250, 324		
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched: Classification System: U.S. 435/240.1, 435, 320; 424/89; 514/12; 520/250, 324 Classification System:		
Documentation Searched other than Minimum Documentation: Is the Exam that such Documents are included in the Fields Searched?		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT:		
Category	Citation of Document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevance to Claim No.
X	Cell, vol. 42, issued August 1985, Maddon, "The Isolation and Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding The T Cell Surface Protein T4: A New Member of The Immunoglobulin Gene Family", pp. 92-104, See entire document.	1-3 4-14
Y	ICSU (INTERNATIONAL COUNCIL OF SCIENTIFIC UNIONS) SHORT REPORTS, vol. 2, Advances in Gene technology: Molecular Biology of the Immune System, issued 1985, Littman, "The Isolation and structure of the Genes Encoding The Human T Cell Molecules T4 and T8, pp. 232, 224, See The entire article	1-3
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular importance "T" technical documents not considered as prior art in the international search "X" documents which may show results on priority claims or which are cited to establish the publication date of another document or other technical reason (as specified) "Y" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "Z" documents published prior to the international filing date but later than the priority date (if any)		
"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the examination that filed in substantiating the applicant's or inventor's statement "E" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to improve on the prior art "C" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "D" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "F" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "G" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "H" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "J" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "K" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "L" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "M" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "N" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "O" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "P" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "Q" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "R" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "S" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "T" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "U" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "V" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "W" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "X" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "Y" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art "Z" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to improve on the prior art		
IV. CERTIFICATION Date of the Annual Conference of the International Search: 15 May 1989 Date of Making of the International Search Report: 05 JUL 1989 International Searching Authority: ISA/US Signature of a Searching Officer: T. Wessendorp T. Wessendorp		

International Application No. PCT/US89/00762

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
A. Nature, Vol. 21, issued December 1984, Klatzmann, "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV", pp. 767 and 768. See the entire article.	1-14
A. Science, vol. 209, issued 25 July 1980, Ternhorst, "Biochemical Analysis of Human T Lymphocyte Differentiation Antigens T4 and T8", pp. 520 and 521. See the entire document.	1-14
V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSUBSTANTIATED The International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons: 1. Claim numbers: because they relate to subject matter which is not claimed in the international application. 2. Claim numbers: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out. 3. Claim numbers: because they are dependent claims not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 29.1.	
VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING The International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows: 1. An additional search fee was timely paid by the applicant, and the International Search Report covers all searchable claims of the international application. 2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims: 3. The required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first disclosed in the claims; it is covered by claim numbers: 4. An additional search fee was not paid by the applicant. Consequently, the International Searching Authority did not search the claims for which no fee was paid. Remarks on Prior Art: The additional search fees were not accompanied by applicant's priority. No priority claim was made for the claims for which no fee was paid.	

PCT/US83/00757

International Application No.

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevance to Claim No.
Y	Nature, Vol. 212, Issued December 1984, Dalglish, "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus", pp. 763-766, See the entire document	1-5
X	Cell, Vol. 50, Issued 11 September 1987, Lasky, "Delineation of a Region of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp 120 Glycoprotein critical for interaction with the CD4 Receptor", pp. 975-985, See entire article	1-14

Form PCT/US 83-00757 (Rev. 11-82)

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

A 61 K 37/02

ADY

8615-4C

C 07 K 13/00

8619-4H

C 12 N 5/10

ZNA

15/48

//C 12 P 21/02

C 12 R 1:91)

⑦発明者 アクスル, リチャード

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10027、ニュー・ヨーク、リバーサイド・ドライブ・445

⑦発明者 スウィート, レイモンド・ダブリュ

アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19004、バラ・シンワイド、エツジヒル・ロード・108

⑦発明者 アーソス, ジェイムズ

アメリカ合衆国、ミシガン・48104、アン・アーバ、ヒル・ストリート・2026

⑦出願人 スミスクライン・ベクマン・コーポレーション

アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19101、フィラデルフィア、フランクリン・プラザ・1